INTRODUCERE ÎN BIOLOGIA MOLECULARĂ

G. H. Haggis
D. Michie
A. R. Muir
K. B. Roberts
P. M. B. Walker

INTRODUCTION TO MOLECULAR BIOLOGY

G. H. Haggis
M. A., Ph. D., Editor
Senior Lecturer in the Department of Physiology
University of Edinburgh

D. Michie
M. A., D. Phil.
Director, Experimental Programming Unit
University of Edinburgh

A. R. Muir
M. D.
Professor of Veterinary Anatomy
University of Edinburgh

K. B. Roberts
M. A., D. Phil., M. B., B. S.
Reader in the Department of Physiology
London Hospital Medical College, London

P. M. B. Walker
B. A., Ph. D.
Reader in the Department of Physiology
University of Edinburgh

Longmans

Scanned with OKEN Scanner

INTRODUCERE ÎN BIOLOGIA MOLECULARĂ

G. H. Haggis

M. A., Ph. D., Editor
Senior Lecturer la catedra de fiziologie
a Universităţii din Edinburgh

D. Michie

M. A., D. Phil.
Director la **Experimental Programming Unit**
de pe lîngă Universitatea din Edinburgh

A. R. Muir

M. D.
Profesor de anatomie veterinară
la Universitatea din Edinburgh

K. B. Roberts

M. A., D. Phil., M. B., B. S.
Reader la catedra de fiziologie de la
London Hospital Medical College

P. M. B. Walker

B. A., Ph. D.
Reader la catedra de zoologie
a Universităţii din Edinburgh

Editura Ştiinţifică

Scanned with OKEN Scanner

In româneşte de
FLORIAN HORODNICEANU

LONGMANS, GREEN AND CO LTD
48 Grosvenor Street, London W1
Associated companies, branches and representatives
throughout the world

G. H. Haggis, D. Michie, A. R. Muir, K. B. Roberts, P. M. B. Walker, 1964

Prima ediţie 1964
A doua ediţie 1965
A treia ediţie 1967

Printed in Great Britain by
Western Printing Services Ltd, Bristol

Coperta şi supracoperta de
DUMITRU IONESCU

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Prefață la ediția în limba română 9
Cuvînt înainte 11
Prefață 13
Mulțumiri 17
Din partea traducătorului 18

Capitolul 1
EXAMINAREA CELULELOR VII 19
de K. B. ROBERTS

Aspectul microscopic al celulelor vii. Mișcarea celulelor. Chimiotactismul. Pinocitoza și fagocitoza. Adeziunea celulară. Mitocondriile și alte incluziuni celulare. Nucleul și mitoza.

Capitolul 2
ROLUL PROTEINELOR 40
de K. B. ROBERTS

Metode folosite pentru izolarea și caracterizarea proteinelor. Rolul enzimelor în metabolism. Situarea enzimelor în celulă. Stabilitatea proteinelor.

Capitolul 3
STRUCTURA MOLECULELOR PROTEICE MICI 61
de G. H. HAGGIS

Structura primară. Structura secundară. Gradul încolăcirii sau înfășurării secundare. Structura terțiară. Agregarea subunităților proteice (structura cuaternară). Aspectele dinamice ale structurii proteinelor. Desfășurarea moleculelor de proteină la nivelul unor interfețe. Speculații asupra naturii forțelor implicate în realizarea structurii terțiare și cuaternare.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4
STRUCTURILE PROTEICE MARI ŞI RAPORTUL DINTRE STRUCTURA ŞI FUNCŢIILE PROTEINELOR 109
de G. H. HAGGIS

Componenta proteică a virusului mozaicului tutunului. Componenta proteică a virusurilor sferice mici, Bacteriofagul T_2. Mătasea şi cheratinele. Colagenul şi depunerea de substanţă oseoasă. Fibrina şi enzimele peptice. Mecanismul acţiunii enzimelor. Miozina, actina şi contracţia musculară.

Capitolul 5
EXAMINAREA CELULELOR LA MIRCOSCOPUL ELECTRONIC 147
de A. R. MUIR

Structuri observabile la suprafaţa celulei. Desmozomii şi barele terminale. Fagocitoza şi pinocitoza. Mielina nervilor şi bastonaşele şi conurile retiniene. Membranele celulare interne. Mitocondriile. Reticulul endoplasmic într-o celulă proteino-secretoare. Învelişul nuclear. Reticulul endoplasmic în celulele musculare striate.

Capitolul 6
STRUCTURA ŞI FUNCŢIA MEMBRANELOR 192
de G. H. HAGGIS

Proprietăţile de permeabilitate ale membranelor celulare. Transportul activ, deplasarea apei şi difuziunea favorizată. Trecerea ionilor prin membrane. Compoziţia chimică a membranelor. Proprietăţile fosfolipidelor şi ale altor lipide polare. Modele moleculare ale structurii membranelor deduse din compoziţia lor chimică şi din proprietăţile lor de permeabilitate. Date furnizate de microscopia electronică asupra structurii membranelor citoplasmatice. Interacţiunea dintre proteine şi lipide. Mecanismele moleculare posibile ale difuziunii favorizate şi ale transportului activ. Rolul reticulului endoplasmic în celulele musculare. Sistemul enzimatic organizat al membranelor mitocondriale. Captarea cuantelor de lumină de către bastonaşele din retină şi cloroplaşti.

Capitolul 7
COMPORTAREA CROMOZOMILOR ÎN CURSUL MEIOZEI 241
de D. MICHIE

Teoria plasmei germinative. Mitoza. Meioza. Prima diviziune meiotică. Leptotenul. Zigotenul. Pahiten şi diploten. Metafaza, anafaza şi telofaza. A doua diviziune meiotică.
Crossing-over-ul

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 8

NATURA CHIMICĂ A MATERIALULUI EREDITAR 255

de D. MICHIE

Constanța conținutului în ADN al nucleelor celulare. Natura mutagenilor fizici și chimici. Transmiterea intactă a ADN în cursul diviziunii celulare. Transformarea la bacterii. Variațiile ereditare la virusuri. Structura și modul probabil de replicare a ADN. Dovezi în favoarea replicării semiconservative. Fluxul de informație genetică.

Capitolul 9

STRUCTURA ACIZILOR NUCLEICE ȘI A NUCLEOPROTEINELOR 268

de G. H. HAGGIS

Structura dublelor spirale de ADN. Duble și triple spirale de polinucleotizi. Factori ce determină configurația adoptată de lanțurile de acizi nucleici. ARN și ADN monocatenari. Nucleoprotamine și nucleohistone. Ribozomii și virusurile sferice mici.

Capitolul 10

GENA 300

de D. MICHIE

Natura particulată a eredității. Descoperirile lui Mendel. Grupurile de lincaj, cromozomii și hărțile genetice. Ce se înțelege prin „genă"? Definiția experimentală a unității funcționale. Limitele cartografierii genetice. Descifrarea în amănunt a hărții genetice. Declanșarea și întreruperea funcționării genelor.

Capitolul 11

HEMOGLOBINELE 340

de K. B. ROBERTS

Anemia cu hematii falciforme (drepanocitoza). Distribuția geografică a genei caracterului falciform. Alte hemoglobine anormale. Hemoglobinele în cursul dezvoltării individului. Componente hemoglobinice minore. Evoluția moleculară a hemoglobinelor.

Capitolul 12

SINTEZA PROTEICĂ 360

de P. M. B. WALKER

Tehnicile moderne de cercetare a sintezei proteice. Componentele celulare esențiale pentru sinteza proteică. Legarea aminoacizilor de moleculele de ARN de transfer. Încorporarea aminoacizilor în lanțurile pepti-

Scanned with OKEN Scanner

dice. Dovezi ale existenței unui „mesager" care transportă informația genetică la locul sintezei proteice. Codul. Descifrarea codului. Interacțiunea dintre ARN mesager și ARN de transfer la nivelul ribozomului. Înfășurarea lanțului peptidic după părăsirea ribozomului.

ANEXE 395

de G. H. HAGGIS

1. Tehnica difracției cu raze X 395
2. Legături de hidrogen. Structura atomică și submoleculară 401
3. Stabilitatea α -helixului 408
4. Formarea imaginii de către electroni 413
5. Presiunea osmotică. Echilibrul ionic transmembranic 418
6. Originea vieții 423

Bibliografie 429
Surse bibliografice ale figurilor 446
Index de autori 449
Index tematic 454

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ LA EDIȚIA ÎN LIMBA ROMÂNĂ

Salutăm această traducere şi sperăm că ea va contribui la întărirea legăturilor şi a schimburilor de idei între cercetătorii români şi cei de limbă engleză. Dr. Horodniceanu a inclus în textul traducerii unele modificări minore, apărute în ultima retipărire a lucrării (1967), asigurînd astfel aducerea la zi a traducerii în limba română. Deşi la unele capitole s-ar fi putut aduce astăzi dovezi suplimentare în sprijinul concluziilor prezentate, rezultatele cercetărilor recente nu au impus totuşi o revizuire cît de cît substanţială a principiilor de bază ale biologiei moleculare fundamentate în perioada 1950—1965 şi expuse în acest volum.

G. H. HAGGIS
Decembrie 1967

Scanned with OKEN Scanner

CUVÎNT ÎNAINTE

Progresele revoluționare înregistrate astăzi în cunoașterea materiei vii nu pot fi comparate decît cu inventarea microscopului optic în secolul al șaptesprezecelea. Confuzii care pentru noi sînt de neimaginat, cum ar fi confundarea unui tendon cu un nerv, erau inevitabile în acea vreme cînd proprietăți ale țesuturilor, accesibile nemijlocit privirii și simțului tactil — culoarea, senzația de dur sau de moale — ,aveau valoare de caractere distinctive importante. Cu apariția microscopului optic, deosebirile observate în structura celulară au ajuns să constituie noi criterii de caracterizare, multe dintre cele vechi pierzînd din importanță. În același timp s-au dezvoltat o nouă fizică și o nouă chimie, care au furnizat elemente pentru explicarea comportamentului mecanic și chimic al structurilor nou descoperite.

În același mod, microscopia electronică a furnizat în ultima vreme un volum uriaș de informații asupra structurilor aflate la limita sau sub limita puterii de separare a microscopului optic. Mitocondriile, pe care microscopul optic ni le înfățișase ca simple firicele sau corpusculi, apar sub microscopul electronic ca fiind delimitate de o pereche de membrane, membrana internă formînd ample invaginări înspre interiorul corpului mitocondrial. Se apreciază că aceste membrane constituie suportul sistemului ordonat de enzime răspunzătoare de fosforilarea oxidativă. Paralel cu aceste progrese realizate de cercetările morfologice, metodele fizice și chimice au permis cuceriri importante

Scanned with OKEN Scanner

în studiul structurii moleculare a enzimelor şi a altor proteine, iar cercetarea structurii moleculelor de acizi nucleici a deschis o eră nouă în genetică.

Autorii acestei cărţi şi-au propus să demonstreze inexistenţa unor graniţe stricte între căile morfologică, biochimică, biofizică şi genetică de cercetare a celulelor vii. Aceste ramuri diferite ale ştiinţei biologice se întregesc astăzi una pe cealaltă, permiţînd o înţelegere mai cuprinzătoare a diversităţii şi unităţii proceselor moleculare ce se desfăşoară în celulă.

D. WHITTERIDGE

Catedra de fiziologie
Universitatea din Edinburgh

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

În „Harvey Lectures" din 1950, W.T. Astbury a definit sensul n care utilizează noțiunea de biologie moleculară după cum urmează:

„Biologia moleculară urmărește...descoperirea, dincolo de manifestările ce au loc la scara biologiei clasice, a substratului molecular corespunzător. Ea cercetează în special formele moleculelor biologice și evoluția, diversificarea și punerea lor în valoare pe măsura trecerii la niveluri din ce în ce mai înalte de organizare. Biologia moleculară are o vedere predominant tridimensională și structurală, ceea ce nu înseamnă însă că ea poate fi privită doar ca o morfologie de mai mare finețe. Ea trebuie neapărat să pătrundă, în același timp, în problemele de geneză și funcție".

Considerînd definiția lui Astbury drept valabilă și astăzi, putem spune că biologia moleculară se ocupă în primul rînd de structura proteinelor, acizilor nucleici și altor molecule mari, precum și de structura amănunțită a miofilamentelor, cromozomilor, ribozomilor și altor componente celulare. Analizarea structurii nu poate fi însă separată de cercetarea funcției. Țelul nostru final este de a înțelege modul în care structura miofibrilelor determină interacțiunea lor în cursul contracției musculare, modul în care structura cromozomilor și ribozomilor condiționează specificitatea sintezei proteice, modul în care structura membranelor stă la baza transportului activ al metaboliților.

Această carte nu se limitează deci la discutarea structurilor biomoleculare; ea cuprinde totodată date din domeniile biochimiei, citologiei, geneticii, microbiologiei şi fiziologiei, esenţiale pentru înţelegerea funcţiei şi activităţii macromoleculelor din celulă.

Cartea se adresează înainte de toate studenţilor în biologie şi medicină din al doilea şi al treilea an de studiu, precum şi cercetătorilor aflaţi în primii ani ai activităţii lor ştiinţifice. Ea poate fi utilă, de asemenea, studenţilor în fizică şi chimie pe care îi interesează progresele recente ale biologiei la nivel molecular. Modul de tratare presupune din partea cititorului unele cunoştinţe esenţiale de fizică şi chimie, dar nu este indispensabil ca el să aibă cunoştinţe prealabile de biologie.

Planul cărţii este următorul. Primul capitol, asupra examinării celulelor vii la microscopul cu contrast de fază, are caracter introductiv şi nu este cîtuşi de puţin „molecular". Scopul său este de a situa problemele ce urmează să fie discutate în capitolele următoare într-o perspectivă biologică şi de a scoate în relief unele aspecte dinamice ale structurii celulei, care pot fi uşor pierdute din vedere în cursul unor cercetări mai amănunţite, dar statice, întreprinse cu ajutorul microscopului electronic sau al tehnicii de difracţie cu raze X. El se adresează îndeosebi cititorilor nefamiliarizaţi cu aspectul microscopic al celulelor, dar el poate fi util şi celor care au studiat histologia fără să fi avut prilejul să urmărească mişcarea celulelor vii în culturi. După acest capitol introductiv, am urmărit în primul rînd să subliniem importanţa proteinelor pentru activitatea celulară (cap. 2) şi să discutăm structura şi funcţia lor (cap. 3 şi 4), apoi să arătăm care este importanţa membranelor în ultrastructura celulară (cap. 5) şi să discutăm structura şi funcţia lor (cap. 6). Factorii care determină structura proteinelor — legăturile de hidrogen, efectele hidrofobe şi forţele electrostatice — sînt discutate mai amănunţit în cap. 3, întrucît aceiaşi factori

Scanned with OKEN Scanner

determină şi structura membranelor lipoproteice şi a nucleoproteinelor, care vor fi analizate în capitolele ulterioare.

În partea a doua se abordează în acelaşi mod discutarea acizilor nucleici. În cap. 7 este descrisă comportarea cromozomilor în cursul meiozei, aşa cum apare în celula vie, sub microscopul cu contrast de fază. Capitolul 8 este consacrat datelor care atestă că baza materială a eredităţii este reprezentată de acizii nucleici cromozomiali, cap. 9 — structurii acizilor nucleici iar cap. 10 — progreselor recente realizate cu ajutorul analizei genetice fine, care a făcut posibilă corelarea evenimentelor mutaţionale cu modificări ale structurii acizilor nucleici. Efectele mutaţiilor asupra structurii unei proteine sînt ilustrate printr-o discutare a hemoglobinelor (cap. 11), iar capitolul final este consacrat sintezei proteinelor. Unele probleme teoretice mai dificile, anumite detalii ale unor tehnici experimentale, precum şi o discuţie speculativă asupra originii vieţii sînt cuprinse în anexe succinte.

G. H. HAGGIS

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

MULȚUMIRI

Sîntem profund recunoscători unui număr de colegi care au parcurs și discutat anumite capitole și subcapitole, aducînd astfel contribuții importante la definitivarea textului: A. C. Allison, A. D. Bangham, M. Bishop, D. M. Blow, W. Bodmer, G. L. Brown, H. J. Cruft, J. Dainty, M. A. Epstein, J. B. Finean, B. L. Ginsborg, M. M. Harding, H. E. Huxley, J. C. Kendrew, B. R. Malcolm, P. D. Mitchell, J. M. Mitchison, D. Northcote, J. H. Ottaway, G. Pontecorvo, W. N. M. Ramsey, M. Spencer, M. Swann, M. H. F. Wilkins și J. F. Wilkinson.

Sîntem îndatorați editurilor în care au apărut cărțile și revistele citate în lista surselor bibliografice ale figurilor, pentru acordarea permisiunii de a reproduce aceste ilustrații, după cum sîntem recunoscători unui număr de autori citați în această listă și care ne-au pus la dispoziție unele clișee originale în vederea reproducerii.

Sîntem foarte recunoscători dr. R. Passmore pentru ajutorul și sfaturile date în timpul corecturilor de tipar.

Desenele modelelor moleculare au fost făcute de dl. C. Shepley.

Această carte constituie dezvoltarea unui curs ținut în fața studenților de la Edinburgh; planul și tematica inițială, atît a cursului, cît și a cărții, au fost elaborate de dr. K. B. Roberts.

AUTORII

DIN PARTEA TRADUCĂTORULUI

Posibilitatea editării în limba română a *Introducerii în biologia moleculară* se datorează autorilor cărţii şi îndeosebi dr. G. H. Haggis, care au îmbrăţişat cu căldură această iniţiativă. Ei au pus de asemenea la dispoziţia traducătorului textul modificat care a slujit pentru ultima reimprimare a cărţii, aflată sub tipar.

Traducerea în limba română a beneficiat de un preţios ajutor din partea colegilor Andrei Aubert-Combiescu şi Alfred Fenyves. De asemenea, revederea integrală a textului a fost efectuată de Paul Teitel, iar pentru găsirea celor mai potrivite redactări în limba română a anumitor capitole au fost consultaţi Dina Sergiescu şi Viorel Sergiescu.

Acest ajutor colegial nu scade cu nimic din răspunderea traducătorului pentru calitatea textului şi fidelitatea lui faţă de original.

Iconografia ediţiei în limba română se datoreşte muncii ireproşabile a graficienilor Paulian Valeria şi Mircea Poiană.

Tuturor acestora le aduc sincere mulţumiri.

FLORIAN HORODNICEANU
Decembrie 1967

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1

EXAMINAREA CELULELOR VII

În trecut, pentru a pune în evidenţă structura animalelor şi plantelor, biologii nu aveau la îndemînă decît pensa şi bisturiul; ei puteau observa numai ceea ce se vedea nemijlocit, cu ochiul liber. Folosind asemenea metode, anatomiştii italieni din vremea Renaşterii au făcut disecţii şi au reprodus anatomia omului şi animalelor în desene de o mare precizie şi eleganţă. Mai tîrziu, o dată cu perfecţionarea lentilelor şi apoi — la începutul secolului al XIX-lea — a microscoapelor compuse, s-a putut descrie structura ţesuturilor vii, aşa cum apare la o mărire a imaginilor acestora de cîteva zeci sau sute de ori. Curînd s-a observat că, sub microscop, structurile analizate de vechii anatomişti îşi dezvăluiau părţile lor componente — celulele şi materialul intercelular. Observaţia a pătruns şi mai în adîncime, arătînd însăşi structura celulelor, iar astăzi avem în urma noastră un secol de asemenea investigaţii citologice.

Vechii microscopişti studiau adesea preparate vii, dar mai tîrziu, cînd industria chimică a produs o mare varietate de coloranţi, mulţi dintre cercetători au trecut la examinarea de secţiuni de ţesuturi fixate şi colorate. În aceste preparate se puteau vedea mult mai multe detalii decît în materialul tisular proaspăt care, sub lentilă, apare de obicei transparent şi relativ amorf. Observaţiile asupra celulelor vii au completat totuşi aceste studii clasice făcute pe preparate fixate. Începînd din 1942, punerea la punct a unui nou tip de microscop a dus la extinderea observaţiilor asupra celulelor vii. Microscopul cu contrast de fază, folosit în biologie pentru prima dată în acel an, funcţionează în felul următor: dacă două componente celulare transmit aceeaşi cantitate de lumină, ele vor fi greu de deosebit cu microscopul optic obişnuit: dacă însă aceste două componente se deosebesc prin

Scanned with OKEN Scanner

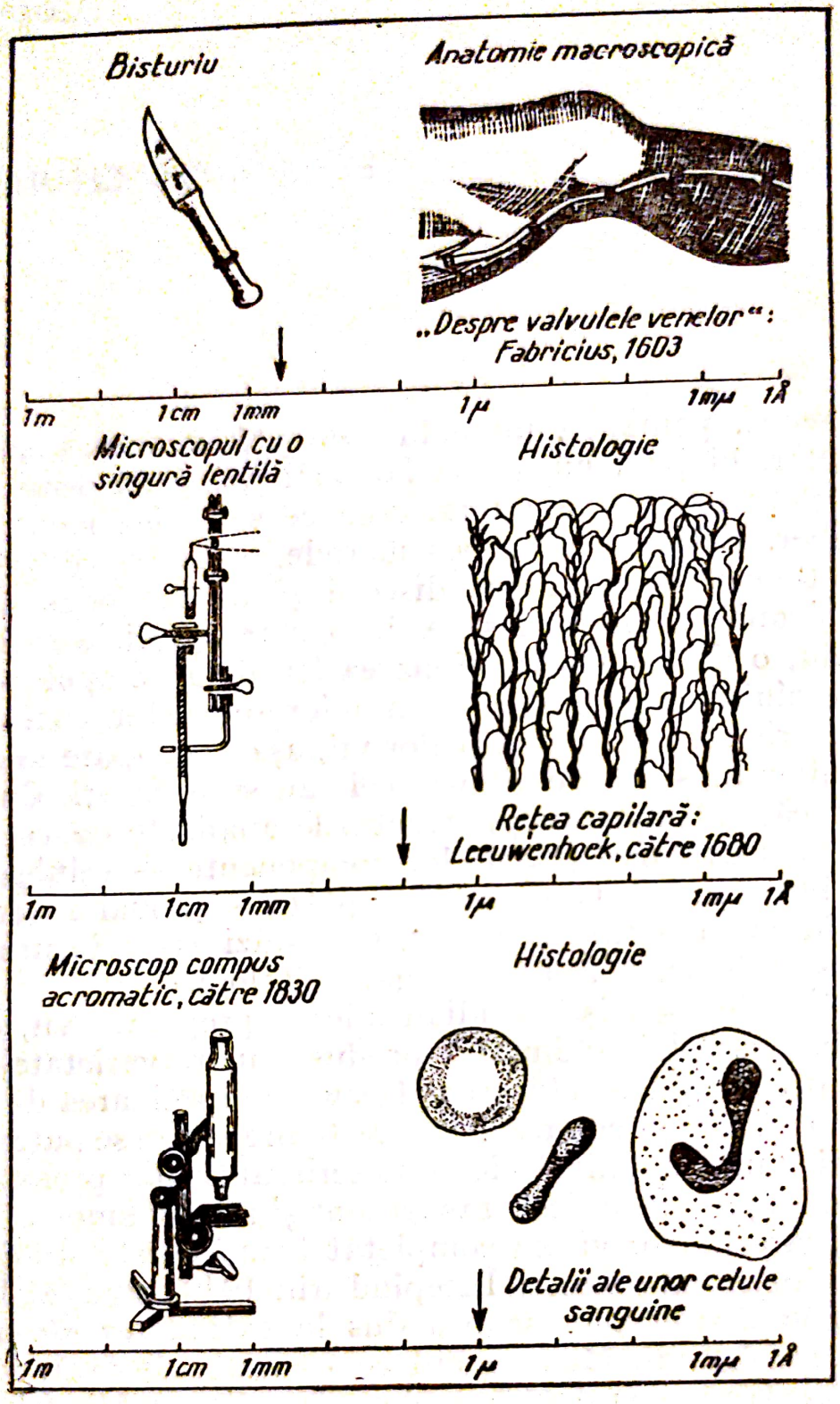
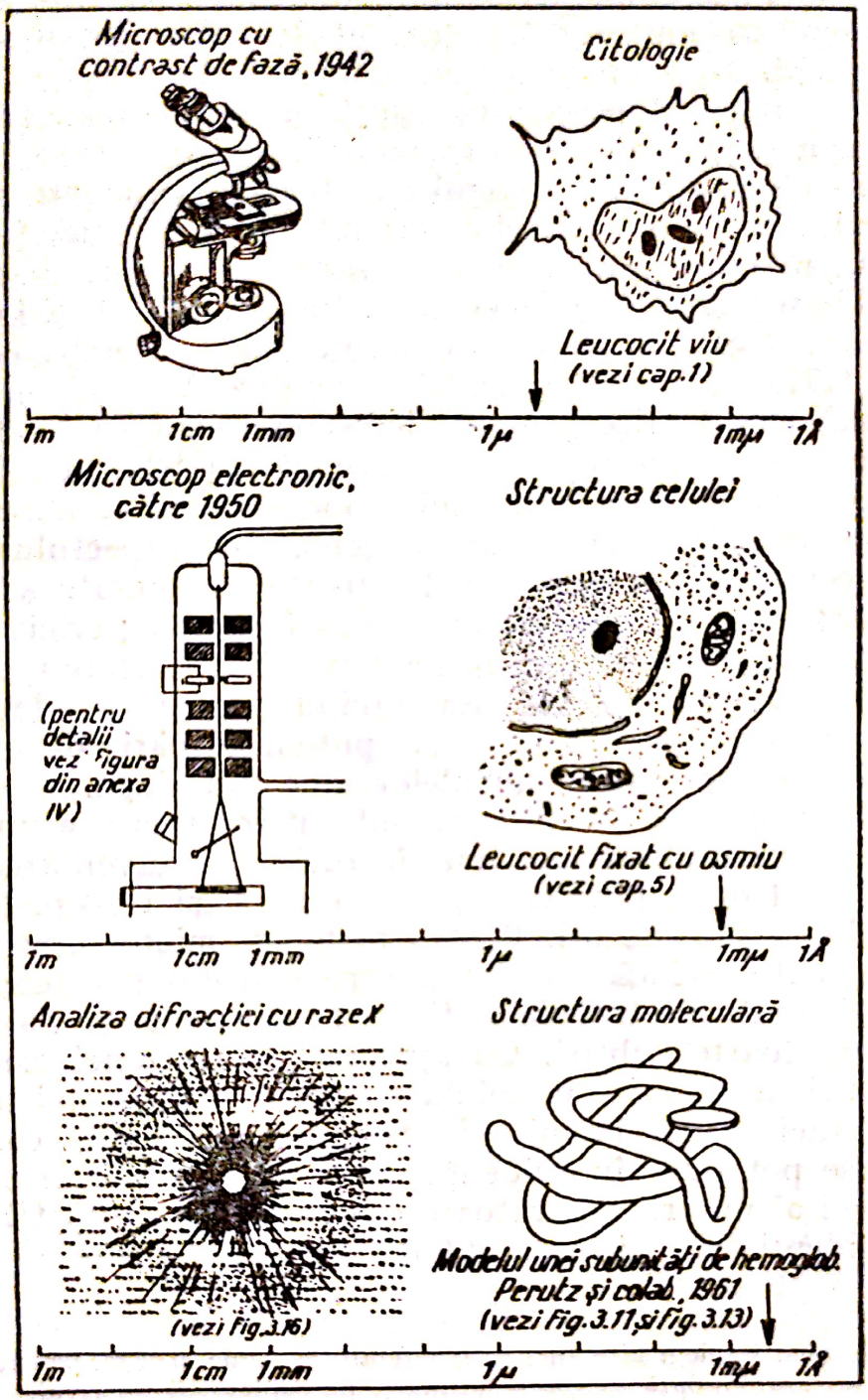


Fig. 1.1. Progresele realizate în biologie după anul 1600, ilustrate prin studiul structurii fine a vaselor și celulelor sanguine.

Limita separatoare utilă a vederii cu ochiul liber este de aproximativ 1/10 mm; lentilele și microscoapele compuse o coboară pînă la aproximativ 1/5 μ (1μ = 1/1 000 mm). Microscopul electronic poate



distinge detalii pînă la 1 mμ (1 mμ = 1/1 000 μ) și permite, spre exemplu, evidențierea unor amănunte structurale ale mitocondriilor. Pînă în momentul de față, studiul cu ajutorul spectrului de difracție cu raze X al moleculelor de hemoglobină din globulele roșii sanguine a atins o putere separatoare de 0,6 mμ. Această tehnică este în curs de perfecționare, urmărindu-se atingerea unor puteri separatoare de 0,2 mμ, cu ajutorul cărora va putea fi determinată poziția intramoleculară a diferiților atomi.

Scanned with OKEN Scanner

indicele lor de refracție, microscopul cu contrast de fază va transforma această deosebire într-o diferență de luminozitate, așa încît ceea ce apărea uniform transparent la microscopul obișnuit devine vizibil la microscopul cu contrast de fază.

Concentrarea atenției anatomiștilor și microanatomiștilor asupra unor detalii din ce în ce mai fine poate fi ilustrată prin cercetările efectuate de-a lungul a patru secole asupra sistemului vascular și asupra sîngelui din interiorul acestuia (fig. 1.1). Anatomia macroscopică a vaselor sanguine a fost descrisă de Vésale (1543) și de Fabricius (1603)*. Malpighi (1661) și Leeuwenhoek (către 1680) au descris anatomia fină a rețelei capilare; Hewson (1777) a desenat globulele sanguine. J. J. Lister a realizat lentilele acromatice pentru microscopul compus și, cu ajutorul lor, a studiat, împreună cu T. Hodgkin (1827), detaliile fine ale vaselor sanguine și ale globulelor sîngelui. Colorațiile lui Romanowsky (1891) au făcut ca cercetarea aspectului morfologic al celulelor sanguine uscate, fixate și colorate să devină unul dintre examenele biologice cele mai curente; oricît de utile ar fi însă, asemenea frotiuri nu ne dau indicații asupra dinamicii funcționale a celulelor vii. Examinînd preparate adecvate la microscopul cu contrast de fază, putem urmări, de exemplu, mișcarea și comportarea globulelor albe din sînge.

În ultimele două decenii s-au obținut informații asupra unor elemente structurale și mai fine, întrucît, prin inventarea microscopului electronic, puterea separatoare** a microscopiei a crescut de cîteva sute de ori. Pentru moment, microscopia electronică nu poate fi încă folosită pentru cercetarea celulelor vii; celulele și țesuturile trebuie să fie mai întîi fixate și apoi tăiate în secțiuni foarte subțiri. Cu ajutorul microscopiei electronice au putut fi descoperite în celulă structuri a căror existență nu putea fi nici măcar bănuită în trecut. În anumite cazuri, în țesuturi se pot pune în evidență chiar unele molecule mari. La acest nivel al puterii separatoare există totuși o altă tehnică ce poate evidenția și mai multe detalii (cu condiția însă ca molecu-

---

* Indicațiile bibliografice (articole, referate generale și cărți) pentru o documentare mai aprofundată se găsesc grupate, pe capitole și paragrafe, în bibliografia de la sfîrșitul volumului. Articolele menționate în lista indicațiilor bibliografice ale figurilor, inserată după bibliografie, constituie și ele o sursă suplimentară de documentare.

** În limbajul curent se utilizează și termenul „putere de rezoluție". — *N.T.*

Scanned with OKEN Scanner

lele studiate să poată fi extrase, purificate şi cristalizate). Prin analizarea spectrului de difracţie cu raze X s-a putut arăta, de exemplu, că hemoglobina extrasă din globulele roşii are o structură caracteristică, molecula ei fiind formată din 4 lanţuri polipeptidice (cap. 3). În acelaşi fel a putut fi determinată şi poziţia exactă a unei bune părţi din atomii care intră în structura moleculei de mioglobină care, ca mărime, reprezintă cam un sfert din cea a hemoglobinei.

Astfel, biologia, care într-o vreme nu putea recurge decît la observarea cu ochiul liber a organismelor, şi-a adîncit cîmpul de observaţie, mai ales în ultimii 20 de ani, asupra unor structuri din ce în ce mai fine, ajungîndu-se ca azi, la microscopul electronic, să fie vizibile chiar moleculele mari; detaliile structurii lor pot fi dezvăluite prin analiza cu raze X, care asigură o putere de mărire de un milion de ori sau chiar mai mult. Contribuţia acestor metode în biologie va fi analizată în alte capitole ale acestei cărţi. Cu toată bogăţia de informaţii de care dispunem astăzi, nu trebuie să uităm totuşi niciodată că în biologie sistemul de referinţă este reprezentat întotdeauna de organismul viu şi de celulele sale componente. Nici chiar studiul virusurilor nu va fi complet cîtă vreme nu vom putea descrie comportarea şi reproducerea lor în interiorul celulelor vii sau al bacteriilor pe care le parazitează.

În consecinţă, pentru a crea cadrul necesar înţelegerii tabloului la nivel molecular, este necesar să descriem în acest capitol elementele ce pot fi observate atunci cînd se examinează comportarea şi structura celulelor vii cu microscopul optic, mai ales în contrast de fază.

ASPECTUL MICROSCOPIC AL CELULELOR VII

Cînd Robert Hooke a privit prin microscopul lui suprafaţa de secţiune a unui dop de plută, el a observat că spaţiile celulare erau separate între ele prin pereţi de celuloză. Aspectul lor se asemăna, după el, cu o îngrămădire de mici cămăruţe ca nişte cutii; iată de ce le-a denumit celule (1665). De-abia către anul 1830 a fost recunoscută existenţa celulelor ca un fenomen general şi pentru ţesuturile animale. S-a observat că celulele animale erau mărginite de membrane cu mult mai subţiri decît

Scanned with OKEN Scanner

cele ale celulelor vegetale; mai tîrziu, s-a descoperit că şi celulele vegetale au membrane subţiri pe partea interioară a pereţilor celulozici care, în comparaţie cu ele, sînt mult mai groşi.

Robert Brown, botanistul scoţian care a descris fenomenul cunoscut astăzi sub numele de mişcare browniană, a observat, examinînd la microscop celule de orhidee, o formaţie situată în centrul acestora: nucleul (1833). Ulterior s-au găsit nuclee nu numai în celulele vegetale, ci şi în cele animale. În celule putem recunoaşte numeroase tipuri de incluziuni, dar elementele lor caracteristice rămîn nucleul şi membrana perinucleară. Cu toate acestea, globulele roşii ale mamiferelor sînt lipsite de nucleu, iar nucleele bacteriilor prezintă o organizare diferită de aceea a nucleelor altor celule.

Astăzi, membrana care mărgineşte celula — şi care constituie o barieră de permeabilitate între conţinutul celulei şi mediul înconjurător — poartă în general denumirea de *membrană citoplasmatică*. Ea este întărită la multe celule vegetale de un perete celulozic exterior; o altă formaţie dură, întîlnită la crustacee, este chitina. Membrana însăşi nu poate fi văzută cu nici un fel de microscop optic, fiind mult prea subţire; de obicei, indicele de refracţie al citoplasmei diferă de cel al fluidului înconjurător şi, datorită acestui fapt, conturul celulei poate fi recunoscut cu uşurinţă. Forma unei celule vii nu depinde numai de tipul celular, ci şi de compoziţia şi proprietăţile fizice ale mediului în care trăieşte. Dacă un fragment de muşchi cardiac este inclus într-un cheag de plasmă şi apoi incubat la 37°C, unele dintre celulele ţesutului fibros (fibroblaşti) se deplasează din fragmentul de muşchi în plasmă, unde comportarea lor poate fi uşor urmărită în contrast de fază. Pe o lamă de sticlă pe care au fost gravate o serie de linii paralele, fibroblastul se va alungi, orientîndu-se de-a lungul şanţurilor; înglobat în plasma coagulată, el apare mai umflat şi cu o formă întrucîtva stelată. Aspectul anumitor celule epiteliale crescute în culturi de ţesuturi poate fi profund influenţat de concentraţia de vitamină A din mediu. În prezenţa unei cantităţi suficiente de vitamina A, celulele nu mai formează, ca de obicei, un epiteliu scuamos cheratinizat. În schimb, ele se diferenţiază, dînd naştere unui epiteliu care secretă mucus şi este adeseori ciliat.

Un caz remarcabil de dependenţă a formei unei celule de compoziţia chimică a mediului înconjurător a fost descris de

Scanned with OKEN Scanner

Willmer la o amibă, *Naegleria gruberi*: în funcţie de concentraţia diferitelor săruri din mediu, acest organism poate lua cînd forma amiboidă obişnuită, cînd pe cea a unui flagelat care înoată liber.

Alte detalii ale aspectului microscopic al celulelor vii vor fi discutate în paragrafele viitoare.

MIŞCAREA CELULELOR

Examinînd cu răbdare o cultură de fibroblaşti vii la o temperatură de 37°C, se poate observa cum celulele îşi modifică lent forma. Această mişcare poate fi studiată desenînd aspectul celulelor la anumite intervale, de exemplu, la fiecare 3 minute; ilustrarea cea mai spectaculoasă a acestui proces se obţine însă folosind cinematografia cu „contracţie de timp" (accelerată): clişeele succesive ale filmului sînt expuse la anumite intervale, de exemplu, 10 secunde, după care filmul este proiectat cu viteza normală; viteza mişcărilor celulare este astfel mult accelerată.

Globulele albe din sînge care conţin granulaţii (granulocite) se deplasează mult mai repede decît fibroblaştii, iar mişcările lor pot fi observate direct, fără filmare. Într-adevăr, cînd sînt examinate printr-un obiectiv cu imersiune în ulei care măreşte de aproximativ 800 de ori, este necesară mişcarea continuă a platinei microscopului pentru ca granulocitul a cărui mişcare se cercetează să poată fi păstrat în centrul cîmpului. Granulocitele se deplasează ca şi amibele: la marginea celulei, în porţiunea dinspre direcţia de mişcare, se formează pseudopode, în timp ce, concomitent, în alt punct al suprafeţei celulare alte pseudopode sînt retrase în masa citoplasmei. Pseudopodele sînt fine şi lungi, depăşind de cîteva ori diametrul celulei; în aceste filamente granulaţiile lipsesc. În porţiunea cea mai înaintată a unui pseudopod în curs de înaintare citoplasma este, de asemenea, lipsită de granulaţii. Abia mai tîrziu se produce fluxul citoplasmei granulare, uneori şi al nucleului, către acest pseudopod. În cursul mişcărilor amiboidale există deci o deosebire de comportare între zona clară, periferică, a citoplasmei — denumită şi ectoplasmă — şi citoplasma granulară, dispusă mai către centrul celulei — endoplasma.

Citoplasma celulelor poate prezenta curenţi de scurgere chiar dacă celula nu se deplasează dintr-un punct în altul, iar

Scanned with OKEN Scanner

membranele majorității celulelor izolate dintr-o cultură se află în continuă mișcare. Această mișcare a membranei poate fi observată dacă se examinează pe lamă culturi de monocite (globule albe monocitare) recoltate din lichidul peritoneal. Imediat după așezarea preparatului pe platina încălzită a microscopului, aceste celule au o formă mai mult sau mai puțin sferică, întrucît stătuseră la temperatura camerei. După ce au fost supuse cîteva minute la temperatura de 37 °C ele încep să se întindă, devin plate și aderă de suprafața sticlei, după care emit pseudopode caracteristice. Dacă se examinează cu atenție, în contrast de fază, marginea subțire a unei asemenea celule aplatizate, se observă că ea prezintă o mișcare ondulatorie continuă ; conturul celulei este neregulat și se modifică tot timpul. Marginea majorității celulelor, cel puțin în condiții de cultivare *in vitro*, nu ar trebui reprezentată printr-o linie dreaptă sau ușor curbă, obținută printr-o singură trăsătură de condei, ci sub o formă tot atît de neregulată ca harta Greciei. Mai mult, aceasta va reprezenta doar suprafața celulară la un anumit moment dat, întrucît conturul se schimbă mereu.

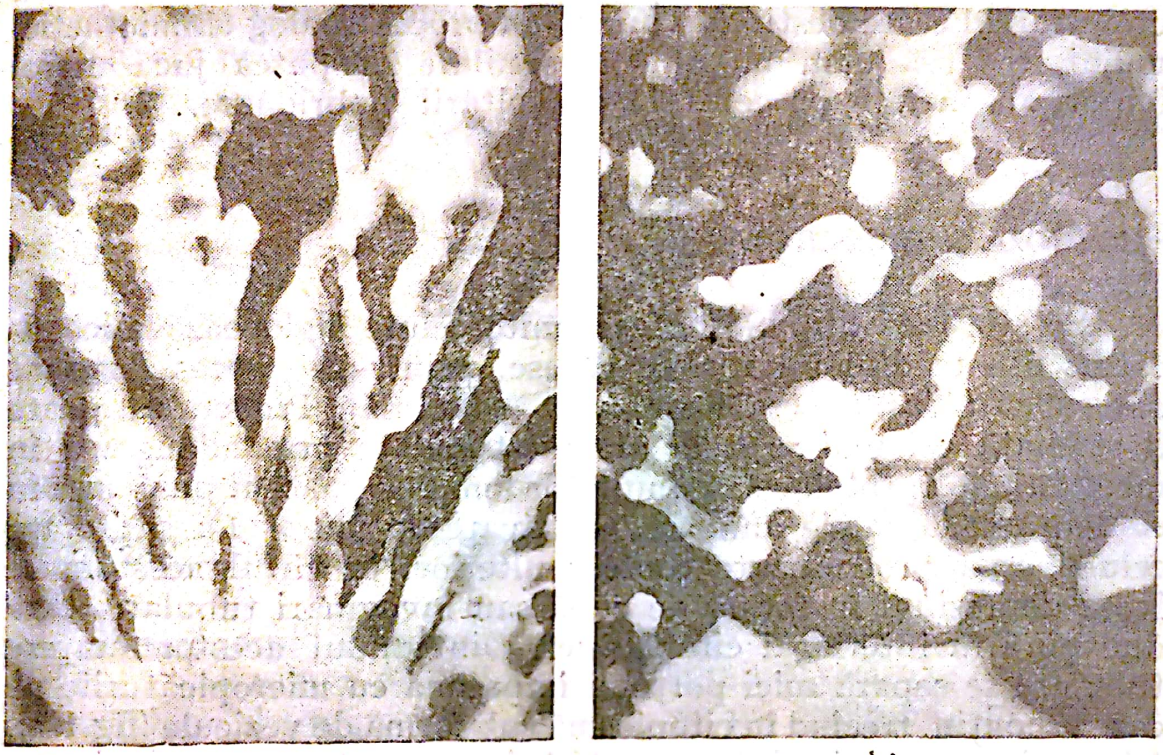
Mișcările particulelor și granulelor ce se găsesc în celule pot fi urmărite deosebit de bine prin filmarea accelerată a culturilor de țesuturi izolate. Curenții citoplasmatici pot fi puși în evidență și la plante, de exemplu, în stratul subțire de citoplasmă care înconjură vacuola celulei gigante a algei *Nitella*. Mișcarea activă a granulațiilor celulare trebuie deosebită de mișcarea browniană : aceasta din urmă se observă la particulele suspendate liber în lichidul vacuolelor citoplasmatice, precum și atunci cînd se produce o lichefiere a citoplasmei, în care caz celula este, probabil, moartă. Viscozitatea citoplasmei normale împiedică producerea unor mișcări browniene nete ale conținutului celular.

CHIMIOTACTISMUL

Într-un preparat pe lamă, un granulocit izolat se va deplasa la întîmplare, schimbîndu-și mereu direcția într-un mod neregulat. Dacă însă se introduce în mediu un conglomerat de stafilococi omorîți, granulocitele din vecinătate nu se vor mai mișca în mod haotic, ci se vor îndrepta spre bacterii. Atragerea granulocitelor de către un stimul chimic poate fi comparat cu deplasarea

Scanned with OKEN Scanner

unui peşte către hrană de-a lungul unui gradient de concentraţie a substanţelor provenite din aceasta şi dizolvate în mare. Această mişcare direcţionată a celulelor către un stimul chimic este num-i tă chimiotactism. Monocitele prezintă şi ele chimiotactism:



a) b)

Fig. 1.2. *a*) Drumul urmat de monocite în prezenţa unui conglomerat de bacili tuberculoşi.
Toate direle converg direct spre bacili (timp expunere: o oră).
b) Drumul urmat de monocite în prezenţa unui fragment de ţesut muscular. Ambele imagini mărite de 240 de ori (după Harris, 1953).
Acesta nu exercită nici un stimul chimiotactic asupra monocitelor, care se mişcă la întîmplare în jurul lui (timp de expunere: 45 min).

Harris a imaginat o modalitate sugestivă de a-l pune în evidenţă. El a recoltat monocite de iepure din exsudatul peritoneal şi le-a menţinut în cultură pe lamă. Le-a iluminat lateral, astfel încît la microscop apăreau sub forma unor puncte luminoase (examen pe fond întunecat). Apoi le-a fotografiat, lăsînd obturatorul deschis timp de cîteva minute. Deplasarea fiecărui monocit în acest răstimp apare pe film sub forma unei dîre luminoase. De obicei, dungile astfel obţinute arătau că celulele s-au deplasat la întîm-

Scanned with OKEN Scanner

plare; cînd în preparatul examinat se introducea însă un stimul chimiotactic adecvat, de exemplu un conglomerat de bacili tuberculoşi omorîţi, fotografia arăta că toate monocitele se îndreaptă către acest conglomerat (fig. 1.2).

Un axon în curs de creştere sau de regenerare şi-ar putea croi drumul către destinaţie printr-un proces analog chimiotactismului, tot aşa cum mecanisme similare ar putea juca un rol important în alte procese ale dezvoltării embrionare.

PINOCITOZA ŞI FAGOCITOZA

Se ştie încă din 1931 că anumite celule înglobează mici picături din mediul în care se găsesc, printr-un proces denumit *pinocitoză* (*pinein* = a bea; *cytos* = celulă). Pinocitoza poate fi studiată cel mai uşor la amibe stimulate prin adăugarea în mediu a unor proteine sau anumitor ioni; ea poate fi pusă însă în evidenţă şi la celule animale cultivate *in vitro*. La suprafaţa celulei apar proeminenţe conice; ulterior, în vîrful acestora se ivesc depresiuni în formă de cupă sau invaginări tubulare, care duc pînă în interiorul citoplasmei. Din fundul acestor cratere tubulare se separă mici porţiuni împreună cu micropicăturile pe care le conţin, trecînd în citoplasmă sub formă de vezicule (fig.1.3). Dimensiunea unei picături astfel încorporate poate fi foarte mică; la limita sau chiar sub limita separatoare a microscopului optic; imaginile obţinute cu microscopul electronic au arătat că, de fapt, acest proces se desfăşoară chiar la niveluri structurale şi mai fine (cap. 5). Celule din cele mai diferite tipuri, ca monocitele, celulele endoteliilor capilare şi celulele lui Schwann de la nivelul fibrelor nervoase, manifestă capacitatea de a pinocita. Pinocitoza se poate produce şi printr-un mecanism întrucîtva diferit. Am menţionat mai sus că periferia monocitelor întinse în suprafaţă ondulează şi îşi modifică neîntrerupt forma. Examinînd sub microscop marginea ondulată a celulei se poate vedea cum aceasta încorporează mici picături de lichid care trec apoi în profunzimea citoplasmei sub formă de vezicule.

Încorporarea, de către anumite celule, a unor proteine cu greutate moleculară mare ar putea fi explicată, poate, prin pinocitoză. Am văzut că proteinele pot induce o activitate pinocitară intensă. Experienţe mai recente au arătat că veziculele

Scanned with OKEN Scanner

de pinocitoză sînt pline cu un lichid care nu este identic cu mediul înconjurător, ci conţine anumite componente în concentraţie mare. Etapa preliminară formării veziculelor constă într-o adsorbţie activă a proteinei inductoare pe membrana celulară, adsorbţie care duce la concentrarea selectivă a acestei proteine în vezicule. Acest proces este dovedit de următoarea experienţă.

Se prepară un anticorp faţă de o proteină care poate induce pinocitoza. Anticorpul este apoi cuplat cu o substanţă fluores-

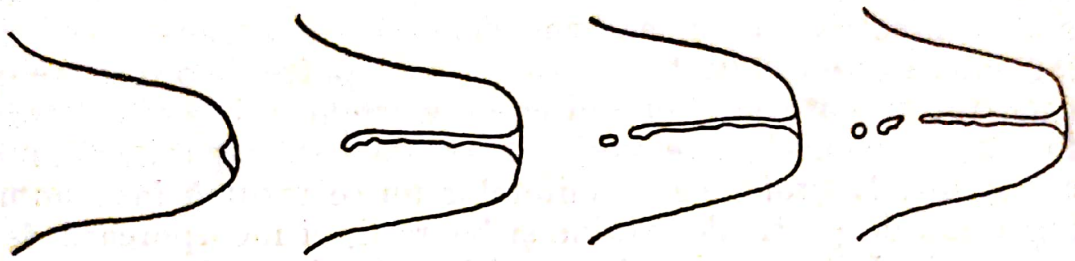


Fig. 1.3. Ilustrare schematică a momentelor succesive ale pinocitozei la amibe. Se formează un pseudopod scurt, care proemineză la suprafaţa celulei. În acest pseudopod ia naştere un canal tubular care progresează în sens invers. Prin fragmentarea capătului rotund al acestui canal se formează vezicule (după Rustad, 1961).

centă. Anticorpii sînt proteine care apar în sîngele unui animal după ce acestuia i s-a injectat o proteină străină; anticorpul produs faţă de o proteină străină se va combina specific cu aceasta şi numai cu ea. Anticorpul fluorescent se va combina deci specific cu proteina inductoare de pinocitoză. Într-un mediu conţinînd această proteină se introduc amibe care, la diferite intervale, sînt congelate rapid şi astfel constituenţii celulari îşi păstrează, în mare măsură, poziţia pe care o ocupau în celula aflată în stare de activitate. Apa poate fi îndepărtată din celulele congelate prin introducerea acestora în vid. Peste ele se adaugă apoi anticorpul specific fluorescent, iar preparatul se examinează la microscop folosind pentru iluminare radiaţii ultraviolete. În cazul celulelor congelate la scurt timp după contactul cu proteina inductoare a pinocitozei, fluorescenţa apare la suprafaţa amibei, indicînd adsorbţia pe membrană a proteinei inductoare. Imaginile ulterioare arată că membrana care a adsorbit această proteină se invaginează, formîndu-se astfel o multitudine de canale de pinocitoză. Veziculele care se rup din aceste canale se deplasează apoi şi mai profund în celulă. În alte experienţe, anticorpii fluorescenţi au fost utilizaţi, pe baza aceluiaşi principiu, pentru determinarea localizării unor proteine specifice în

Scanned with OKEN Scanner

celule şi ţesuturi. Această tehnică extinde sfera de cuprindere a microscopiei, ea oferindu-ne un mijloc de colorare extrem de specific şi de sensibil, ce poate fi aplicat unui produs congelat nefixat.

Se ştie de mult că microorganismele de tipul amibei pot înglobа în citoplasma lor particule solide. Acest lucru este valabil şi pentru unele celule ale speciilor pluricelulare. Procesul poartă numele de *fagocitoză*. Mecinikov, marele zoolog rus care a lucrat cu Pasteur la Paris, a descris rolul fagocitozei în apărarea organismului împotriva invaziei bacteriene. La mamifere, acest tip de fagocitoză este asigurat în cea mai mare parte de o serie de celule care sînt grupate sub denumirea de *macrofage* şi se află răspîndite în tot organismul; este vorba de celule mari, capabile să „mănînce" mult. Macrofagele mamiferelor nu se rezumă însă numai la ingerarea de particule străine şi bacterii, ci încorporează de asemenea rămăşiţele globulelor roşii îmbătrînite, cele traumatizate, cît şi detritusurile celulare. Trebuie menţionat că şi celulele altor ţesuturi, cum ar fi cele din ficat, conţin uneori elemente particulate pe care le-au ingerat.

ADEZIUNEA CELULARĂ

Fotografiind culturi de fibroblaşti prin metoda filmării cu contracţie de timp, se poate observa şi o altă proprietate a membranelor celulare. La periferia culturii, mişcările exploratorii continue ale membranelor prezintă maximum de amploare în acele zone ale suprafeţei celulare care nu vin în contact cu alte celule. Contactul dintre suprafeţele celulare pare să inhibe motilitatea. Multiplicarea fibroblaştilor normali în cultură produce un strat continuu de celule care aderă una de alta. Este demn de menţionat faptul că anumite tulpini celulare provenite din tumori maligne ale ţesutului conjunctiv nu prezintă nici inhibiţie de contact a motilităţii, nici adeziune. Aceste celule sarcomatoase pot fi văzute mişcîndu-se liber în cultură unele peste altele şi avînd tendinţa mai degrabă de a se separa decît de a forma un strat continuu.

Efectele contactului dintre celule pot fi puse în evidenţă în mod spectacular printr-o experienţă imaginată de Moscona. Acesta a preparat culturi de fibroblaşti şi de celule renale de

Scanned with OKEN Scanner

mamifer. Cu ajutorul tripsinei, el a separat celulele din ambele culturi, obţinînd suspensii de celule izolate. Apoi a amestecat cele două tipuri de celule şi le-a introdus într-un mediu de cultură. După cîteva ore, el a observat că celulele s-au separat unele de altele şi, în loc să găsească celule de ţesut renal şi conjunctiv amestecate la întîmplare, a constatat că se constituiseră grămezi alcătuite din celule de acelaşi fel. Venind în contact, celulele de acelaşi tip aderaseră unele de altele. Mai mult, în culturi mixte conţinînd celule renale şi fibroblaşti de pui de găină, precum şi celule de mamifere de aceleaşi tipuri, s-a observat că specificitatea de ţesut predomina asupra specificităţii de specie: fibroblaştii de pui de găină se alăturau fibroblaştilor de mamifer, în timp ce celulele renale de pui de găină se asociau cu celulele renale de mamifer.

MITOCONDRIILE ŞI ALTE INCLUZIUNI CELULARE

Majoritatea tipurilor de celule posedă mitocondrii; acestea sînt organite citoplasmatice mici, care se găsesc în celulele vegetale, ca şi în cele animale, în organismele unicelulare, ca şi în celulele metazoarelor. Forma mitocondriilor variază de la sferă pînă la elemente filamentoase, iar dimensiunea, de la 0,5 μ sau mai puţin pînă la 6 μ. Numărul mitocondriilor din citoplasmă diferă cu tipul, precum şi, în general, cu gradul de activitate a celulelor în cauză; ele apar în număr mai mare cînd, de exemplu, o celulă secretorie intră în activitate. Adesea, modificările de formă şi mărime ale mitocondriilor constituie o indicaţie precoce de suferinţă a celulei. Detaliile structurale ale unei mitocondrii izolate nu sînt vizibile la microscopul optic; la microscopul electronic însă, ele prezintă un aspect caracteristic (cap. 5).

În celulele vii, mitocondriile sînt în continuă mişcare; cele în formă de bastonaş se pot îndoi şi răsuci, fiind totodată antrenate de curenţii citoplasmatici. Urmărite în timp, se poate observa cum se fragmentează, se alungesc, îşi schimbă forma sau dispar. Despre aceste mişcări şi modificări structurale neîntrerupte ale acestor particule citoplasmatice în celula vie va trebui să ne reamintim atunci cînd vom discuta, în capitolele viitoare, aspectul electronoptic şi activitatea enzimatică a acestor organite.

Scanned with OKEN Scanner

În celula vie examinată în contrast de fază se mai pot distinge, pe lîngă mitocondrii, şi alte incluziuni celulare. Dintre acestea, pot fi menţionate granulaţiile secretorii din celulele glandulare, vacuolele digestive, depozitele cu rezerve de grăsime sau de hidrocarbonate, ca glicogenul şi amidonul. De asemenea, se mai diferenţiază două regiuni, una fiind denumită în genere zona (aparatul) Golgi, cealaltă ergastoplasma. Primele cunoştinţe asupra existenţei lor au fost obţinute prin examinarea celulelor fixate, după tratare adecvată cu argint sau cu alţi coloranţi, dar s-a pus problema dacă nu era vorba, de fapt, de simple artefacte. Ambele structuri pot fi văzute însă şi pe microelectronografii, unde se observă că au structuri net distincte şi complexe, care vor fi discutate în cap. 5. Pornind de la aceste studii, s-a încercat apoi punerea în evidenţă a aparatului Golgi şi a ergastoplasmei în celula vie. Aceste încercări au fost încununate de succes. Aparatul Golgi din celulele epididimale a fost identificat nu numai în celulele în stare fixă, ci şi în cele vii, din care a fost izolat prin centrifugare după dezintegrarea celulelor. Ergastoplasma a putut fi de asemenea observată atît în celulele vii, cît şi după colorare.

Zona Golgi este alcătuită dintr-o aglomerare de saci membranoşi, ceea ce conferă acestei regiuni o deosebită afinitate pentru coloranţii lipoproteinelor, cum ar fi sărurile de osmiu. Ea se găseşte în celulele glandulare şi pare a fi în legătură cu activitatea secretorie (cap. 5). În corpul celulelor nervoase, unde este deosebit de dezvoltată, funcţia sa este mai puţin lămurită.

La microscopul cu contrast de fază, ergastoplasma din celule de tipul celor pancreatice apare ca avînd o structură formată din lamele concentrice. În preparatele fixate, ea prezintă de obicei afinitate pentru coloranţii bazici, datorită conţinutului în acid ribonucleic. Rolul important al ergastoplasmei în activitatea secretorie va fi analizat în detaliu în cap. 5.

Un alt tip de incluziune celulară se întîlneşte în celulele plantelor verzi, care conţin clorofilă. Aceste incluziuni, denumite cloroplaşti, au o ultrastructură şi o organizare moleculară complexă, asupra cărora vom reveni mai tîrziu în legătură cu activitatea lor fotosintetică (cap. 6).

Această succintă trecere în revistă a aspectului celulelor din organismele şi ţesuturile vii nu ne dă decît o imagine sumară a diversităţii structurilor existente. Nu s-a pomenit nimic, spre

Scanned with OKEN Scanner

exemplu, despre cili — apendice flexibile, animate de mișcări vii, ale suprafeței celulare — care se găsesc la bacterii, la organismele monocelulare și la tipuri foarte variate de celule animale. În celulele musculare există elemente contractile care în mușchii aparatului locomotor și în miocard, prezintă o structură striată caracteristică (cap. 4). Trebuie totuși să subliniem că, în ciuda acestei diversități, se poate descrie un tablou unitar al principalelor structuri ale unei celule care, cu unele modificări, corespunde majorității celulelor nucleate.

În mod special, ceea ce prezintă asemănări remarcabile între celule de cele mai variate tipuri este comportarea nucleului în cursul diviziunii somatice a celulei (mitoza). Aspectele mitozei descrise la celulele unui țesut de mamifer, la protozoare sau la plante sînt foarte asemănătoare, deși se pot observa unele deosebiri de detaliu. Dat fiind că am analizat deja comportarea fibroblaștilor și întrucît cultivarea și examinarea acestor celule sînt relativ ușoare, vom încheia acest capitol cu o descriere a fibroblaștilor în diviziune.

NUCLEUL ȘI MITOZA

La începutul mitozei, fibroblastul se rotunjește, luînd o formă aproape sferică și pierzînd, în același timp, proprietățile sale de adezivitate, pseudopodele fiind retrase în celulă. Citoplasma devine deosebit de spumoasă, iar în stadiile ulterioare ale diviziunii intră într-o activitate febrilă. După diviziune, agitația se liniștește și celulele-fiice se întind, se separă și reiau aspectul fusiform, caracteristic al fibroblaștilor în cultură. Dacă se urmăresc cu răbdare fibroblaștii sferici din culturile sănătoase, se observă că majoritatea acestora ajung în cele din urmă să se dividă.

În timp ce în citoplasmă se desfășoară aceste modificări, nucleul suferă și el o serie de transformări succesive de o mare complexitate și precizie. Înainte însă de a le prezenta, să descriem aspectul nucleului celular așa cum arată între mitoze. În interiorul fibroblaștilor se pot observa unul sau două nuclee sferice sau ovalare, iar în interiorul nucleului, unul sau mai mulți *nucleoli*; în rest, interiorul nucleului apare lipsit de elemente structurale. Totuși, în anumite celule se pot observa la microscopul cu contrast de fază filamente răsucite, invizibile la microscopul optic obișnuit: aceste filamente sînt fixate de membrana nu-

Scanned with OKEN Scanner

cleară sau de nucleoli. Ele au fost denumite *cromoneme* şi reprezintă probabil forma sub care se găsesc cromozomii în nucleul intermitotic. Nucleolii sînt formaţii care, de obicei, apar lipsite de structură în celulele vii, deşi uneori s-a descris existenţa unor filamente în interiorul lor. Nucleolii dispar într-o etapă precoce a diviziunii celulare, pentru a reapărea de-abia în fazele tîrzii ale acesteia. Nucleul intermitotic a primit numele de nucleu în repaus ; această denumire este însă eronată, deoarece în această perioadă el se găseşte în faza celei mai intense activităţi de sinteză. Într-adevăr, prin determinări chimice efectuate pe celule izolate şi prin numeroase alte tehnici s-a arătat că, în cursul acestei perioade, are loc dublarea cantităţii de substanţe nucleare, inclusiv a materialului genetic.

Din punct de vedere morfologic, perioada de activitate maximă a nucleului este cea din cursul diviziunii. În prima fază a diviziunii celulare, cromonemele se îngroaşă şi se scurtează, luînd aspectul caracteristic de *cromozomi* deplin dezvoltaţi. Acum membrana nucleară dispare (observaţiile făcute la microscopul electronic şi descrise în cap. 5 arată că ea se rupe în fragmente prea mici pentru a fi vizibile la microscopul obişnuit). Toţi cromozomii apar clivaţi în sens longitudinal şi se adună în zona centrală, ecuatorială, a celulei. Cele două filamente ce compun cromozomul, denumite *cromatide*, se separă apoi şi se deplasează în direcţii opuse, depărtîndu-se de ecuator. După separare, ele poartă numele de cromozomi-fii. Între timp, în citoplasmă a apărut un şanţ, care se adînceşte tinzînd să dividă celula ; cromozomii celor două celule-fiice în devenire se alungesc şi devin mai subţiri. În noile celule se formează la loc membrana nucleară şi reapar nucleolii. Fazele diviziunii celulare sînt deci următoarele :

1. Scurtarea şi îngroşarea cromonemelor, ducînd la apariţia de cromozomi bine individualizaţi în interiorul membranei nucleare — profaza ;
2. Aşezarea cromozomilor în zona ecuatorială — metafaza ;
3. Separarea cromozomilor-fii — anafaza ;
4. Formarea a două nuclee-fiice — telofaza.

Stadiile mitozei sînt reprezentate în fig. 1.4.

Examinînd cromozomii în profază, se observă că cele două cromatide ale fiecăruia dintre ei sînt alăturate una celeilalte, dar nu sînt unite între ele decît într-un singur punct (fig. 1.4 *b*).

Scanned with OKEN Scanner

În acest punct, care pentru fiecare cromozom este situat totdeauna în aceeaşi poziţie, cele două cromatide prezintă o porţiune strangulată, denumită *centromer*. La începutul metafazei, centromerele se dispun în planul ecuatorial al celulei (fig. 1.4*c*). Această aliniere a cromozomilor dă naştere aşa-numitei plăci ecuatoriale. În perioada în care cromozomii se deplasează către ecuator, restul celulei nu rămîne inactiv, ci participă la formarea altor elemente ale aparatului mitotic, printre care fusul mitotic a cărui descriere urmează.

În citoplasma celulelor fibroblastice vii aflate în stare de repaus sau la începutul profazei se poate observa, la microscopul cu contrast de fază, că în imediata vecinătate a membranei nucleare se găseşte un mic corpuscul, *centriolul*. În timp ce cromo-

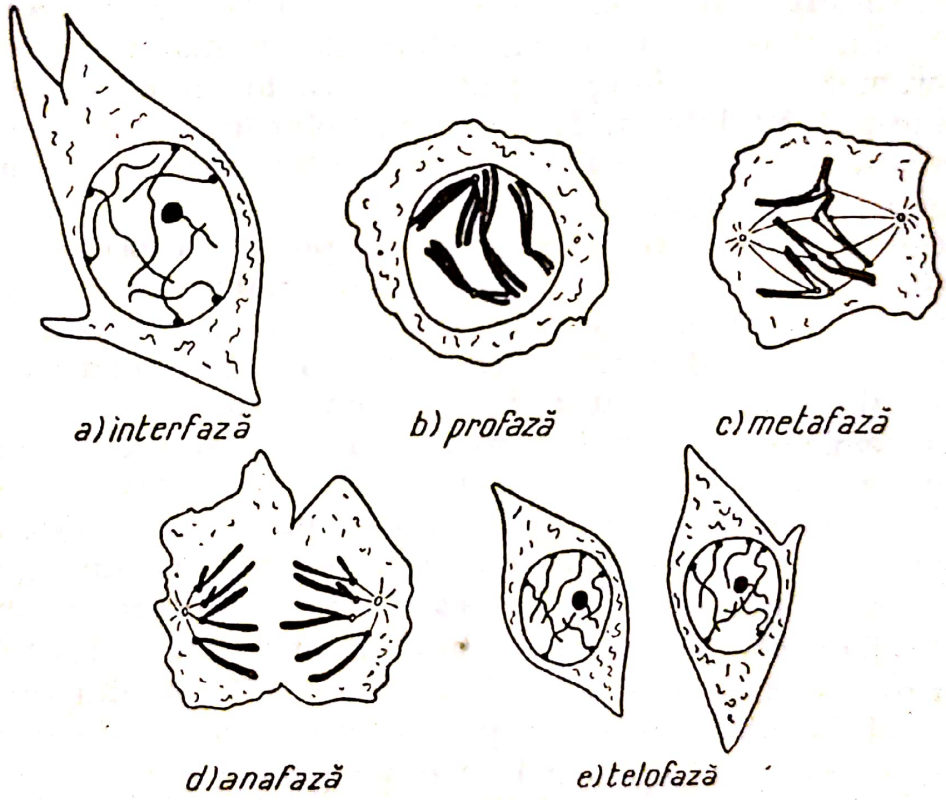


Fig. 1.4. Fazele mitozei.

nemele se scurtează, în profază, centriolul se divide şi cele două jumătăţi se aşază la polii opuşi ai celulei. Centriolii devin focarul din care emerg o serie de filamente radiare care se desfăşoară în citoplasma înconjurătoare, formîndu-se astfel doi asteri.

Scanned with OKEN Scanner

Cînd celula ajunge în metafază și membrana nucleară a dispărut, filamentele asteriene care se îndreaptă către regiunea ecuatorială dau naștere fusului mitotic. În preparatele fixate se vede cum unele filamente ale fusului mitotic sînt legate de centromerele cromozomilor după dispunerea acestora în placa ecuatorială (fig. 1.4 *c*).

În cursul metafazei, centromerele se divid și, după aceasta, o dată cu separarea cromozomilor, începe anafaza. Filamentele fusului par să se scurteze, trăgînd cromozomii-fii către cei doi poli opuși (fig. 1.4 *d*). În cursul acestei deplasări rapide, fiecare cromozom-fiu este îndoit și adeseori apare ca și cînd, în timpul cît este tras către unul din poli, s-ar tîrî în urma centromerului. (Pentru celulele vegetale, această descriere necesită o ușoară modificare ; la majoritatea plantelor nu se formează asteri, deși se observă un fus care se desfășoară între cei doi poli ai celulei.)

La sfîrșitul anafazei, asterii devin mai puțin evidenți, iar cromozomii se alungesc și se subțiază din nou, ceea ce marchează începutul telofazei. În jurul necleelor-fiice se formează o membrană ; un șanț de clivaj care se adîncește treptat duce la separarea celor două celule-fiice. (La plante, separarea celor două celule nu se realizează printr-un proces de strangulare, ci prin formarea unui nou perete intercelular.) În cursul metafazei, mitocondriile se adună în jurul fusului. În anafază, cînd cromozomii-fii se despart, toate mitocondriile celulei se grupează în jurul regiunii ecuatoriale și, o dată cu separarea, în telofază, a celulelor-fiice, mitocondriile se repartizează și ele între cele două celule.

Dat fiind că, în profaza diviziunii următoare, cromozomii apar gata clivați longitudinal în două cromatide reiese că într-o anumită perioadă din faza intermitotică (interfaza) cromonemele formate prin alungirea cromozomilor rezultați din telofaza anterioară trebuie să fi suferit o scindare. După cum am mai arătat, studiile citochimice au pus în evidență o dublare cantitativă a materialului nuclear în această perioadă.

Numărul de cromozomi dintr-o celulă somatică tipică este constant pentru fiecare specie (tabelul 1.1) ; într-o celulă normală există un număr par de cromozomi. La om, de exemplu, există 46 de cromozomi ; printre aceștia deosebim 22 de perechi, cromozomii fiecărei perechi avînd o formă caracteristică, și în plus o pereche care face excepție prin aceea că cei doi membri ai săi

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.1

Numărul de cromozomi la diverse specii de animale

SPECIA	Numărul de cromozomi ($2n$)
Hydra circumcincta	30
Helix aspersa (melc)	54
Daphnia pulex (puricele de baltă)	20
Aphis oenothera (păduchele de plante)	10
Apis mellifica (albina)	16
Drosophila melanogaster (musculița de oțet)	8
Rana temporaria (broasca obișnuită)	26
Gallus gallus domesticus (găina domestică)	78
Mus musculus (șoarecele)	40
Felis catus (pisica)	38
Homo sapiens (omul)	46

sînt asemănători la femei, dar deosebiți la bărbați (fig. 1.5). Aceștia sînt cromozomii de sex. În celulele provenite de la femei și examinate în contrast de fază sau în frotiuri colorate, materialul din care sînt alcătuiți cromozomii de sex apare, în nucleele în interfază, sub forma unui corpuscul de cromatină suplimentar, fixat pe nucleu, care lipsește în celulele rezultate de la bărbați. Acest fenomen se observă destul de bine la granulocite.

Cromozomii umani au fost studiați intens în ultimii cîțiva ani, întrucît s-a observat asocierea anumitor sindroame clinice cu unele anomalii cromozomiale. În mongolism, de exemplu, se întîlnește un cromozom suplimentar. Preparatele de cromozomi pot fi obținute din celule în curs de diviziune, prin cultivarea de fragmente de piele sau măduvă osoasă prelevate de la bolnav. Mai recent, studiile de acest fel au fost ușurate prin descoperirea faptului că limfocitele umane, provenite dintr-o probă redusă de sînge, produc celule care se divid în mod satisfăcător dacă sînt cultivate timp de trei zile în prezența unui extract de fasole (o fitohemaglutinină).

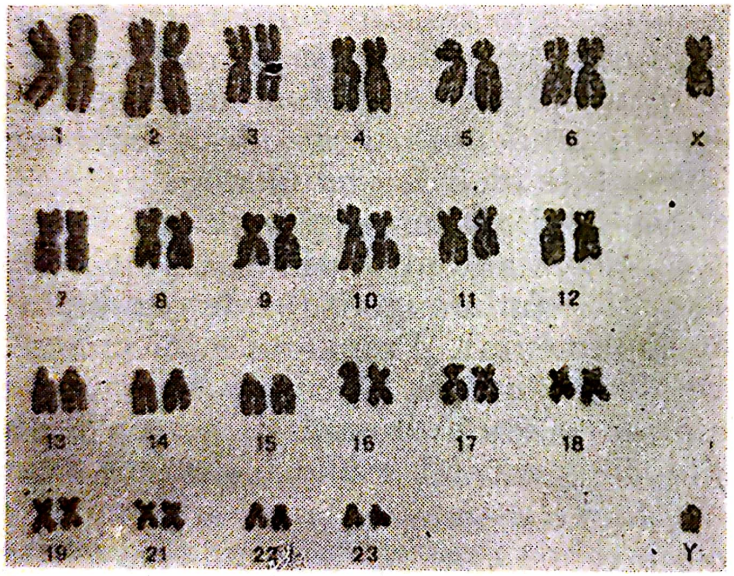
La fiecare diviziune, celulele-fiice primesc cîte un set complet de cromozomi dat fiind că, după cum am văzut, înaintea diviziunii celulare fiecare cromozom suferă un proces de scindare longitudinală. Mai departe, în cuprinsul acestei cărți, vom arăta cum s-a ajuns la concluzia că cromozomii sînt principala cale de transmitere, către toate celulele organismului, a informației ereditare conținute în oul fecundat. Baza fizică a acestui proces este

Scanned with OKEN Scanner

a)

Fig. 1.5. *a*) Cromozomii unui om normal de sex bărbătesc.

O celulă în curs de diviziune a fost zdrobită între două lame de sticlă; s-a realizat astfel împrăştierea cromozomilor aflaţi în metafază, care au fost apoi coloraţi.



b)

b) O copie a microfotografiei reproduse în (*a*) a fost decupată, iar cromozomii au fost aşezaţi în ordine, pe perechi.

De remarcat perechea de cromozomi diferiţi — numerotaţi în această imagine cu nr. 20 şi marcaţi X şi Y — caracteristici bărbatului.
Ambele imagini mărite de aproximativ 2 000 de ori (fotografii obţinute prin bunăvoinţa dr. D. G. Harnden).

reprezentată de scindarea şi repartizarea egală a cromozomilor între cele două celule care rezultă din orice diviziune. În cursul formării gameţilor — celule sexuale — au loc diviziuni celulare de un tip special, în urma cărora spermatozoizii şi ovulele ajung să conţină numai jumătate din numărul de cromozomi existenţi în celulele somatice. Acest proces poartă numele de *meioză* şi va fi descris în cap. 7.

Scanned with OKEN Scanner

Durata desfăşurării fiecărei faze a ciclului mitotic variază de la specie la specie şi de la un tip de celulă la altul : cîteva cifre exemplificative sînt redate în tabelul 1.2.

TABELUL 1.2

Durata diferitelor stadii ale mitozei la celulele splenice de şoarece şi la neuroblaştii de lăcustă

Faza ciclului mitotic	Celule splenice de şoarece la 37°C	Neuroblaşti de lăcustă la 38°C
Interfaza	480—1 080 min	27 min
Profaza	20— 35 min	102 min
Metafaza	6— 15 min	13 min
Anafaza	8— 14 min	9 min
Telofaza	9— 26 min	57 min
TOTAL	523—1 170 min	208 min

(Date extrase din HUGHES, A. F. W., *The Mitotic Cycle*, New York, Academic Press, 1952) şi din CARLSON, J. G. şi HOLLAENDER A., „J. celular comp. Physiol", **31**, 149, 1948).

În acest capitol am descris comportarea şi structura celulei vii, aşa cum ne apar la microscopul cu contrast de fază, deşi trebuie să subliniem că multe dintre aceste observaţii nu au făcut decît să confirme studiile mai vechi, efectuate pe preparate fixate şi colorate. Varietatea de fixatori şi coloranţi folosiţi pentru preparatele examinate la microscopul optic dusese la o cunoaştere amănunţită a artefactelor de fixare, astfel încît concluziile la care s-a ajuns, prin metodele citologice clasice, au fost confirmate, în cea mai mare parte din cazuri, prin examinarea celulelor vii. Spre exemplu, modificările succesive din cursul mitozei au fost descrise încă de mulţi ani pe baza cercetărilor efectuate pe preparate fixate. Examinarea celulelor vii are însă marele avantaj de a permite observarea directă a motilităţii.

În continuare vom analiza şi alte modalităţi de examinare a celulelor, iar în capitolul viitor vom schiţa unele din contribuţiile aduse de metodele biochimice. Vom vedea că şi la nivel molecular, ca şi la nivelul citologic, celula vie se găseşte într-o stare de continuă mişcare şi transformare.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 2

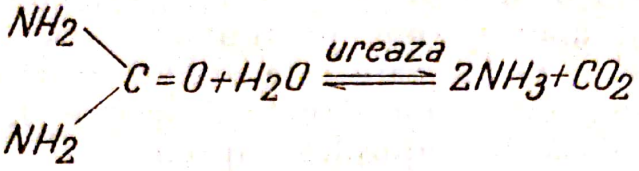
ROLUL PROTEINELOR

În anul 1897 fraţii Buchner au preparat un extract de drojdie de bere care, deşi lipsit de celule, era totuşi capabil să provoace fermentarea alcoolică a zahărului. Prin această experienţă ei au demonstrat că anumiţi „fermenţi", sau enzime, pot să fie separaţi de celulele care le dau naştere şi să continue totuşi catalizarea reacţiilor specifice despre care se credea în trecut că sînt legate în mod obligatoriu de materia vie. Cristalizarea enzimei ureaza de către Sumner în 1926, precum şi a unor enzime proteolitice de către Northrop prin 1930 au constituit progrese de bază în acest domeniu. În monografia publicată în 1958, Dixon şi Webb reproduc fotografiile a 108 enzime cristalizate şi enumeră alte peste 500 de enzime care, deşi nu au fost încă obţinute în stare cristalină, sînt entităţi bine caracterizate.

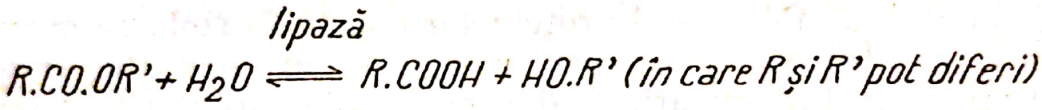
Fiecare dintre aceste enzime catalizează o reacţie chimică sau un grup de reacţii. În acest scop, enzima se combină mai întîi cu reactanţii sau, cum mai sînt denumiţi aceştia, cu substraturile; apoi în substraturi se produce o modificare chimică, după care produşii reacţiei se desfac de pe enzimă; rămasă liberă, aceasta se poate combina cu alte molecule de substrat, catalizînd şi reacţia dintre acestea. Unele enzime se combină numai cu substraturi avînd o anumită structură chimică bine precizată; despre aceste enzime se spune că au un înalt grad de specificitate şi ele catalizează un singur tip de reacţie sau un număr limitat de reacţii. Alte enzime prezintă un grad de specificitate

Scanned with OKEN Scanner

scăzut și catalizează o gamă de reacții mai largă. De exemplu, ureaza este o enzimă care acționează numai asupra ureei:



Ea nu este capabilă să hidrolizeze nici măcar derivatul metilat al ureei, $CH_3NH.CO.NH_2$. Lipazele, pe de altă parte, pot cataliza hidroliza unui mare număr de esteri ai acizilor carboxilici:



Ca și ureaza, majoritatea enzimelor au un înalt grad de specificitate și, întrucît majoritatea reacțiilor complexe din celule sînt de natură enzimatică, rezultă că în celule trebuie să existe un mare număr de enzime. Este evident deci că sinteza enzimelor specifice constituie o problemă centrală a biologiei celulare. Din moment ce enzimele sînt proteine, putem afirma, într-un sens mai general, că sinteza proteinelor este o problemă centrală; vom include astfel în discuție nu numai enzimele, ci și alte proteine celulare. După cum vom vedea în capitolele ulterioare, controlul genetic al activității celulare este mediat de sinteza proteică. Dintre proteinele neenzimatice fac parte, de exemplu, proteine structurale, cum este colagenul, proteine respiratorii, ca hemoglobina, și alte proteine, ca anticorpii, produși ca răspuns la infecții sau la inocularea în țesuturi a unor antigene (proteine sau polizaharizi străini). Structura unei anumite zone de pe suprafața anticorpului este complementară față de cea a unei porțiuni de pe suprafața antigenului corespunzător, tot așa cum suprafața enzimei este complementară față de cea a substratului. Organismul poate produce anticorpi specifici față de o gamă foarte largă de antigene, iar diferiții anticorpi trebuie să se deosebească între ei prin anumite amănunte de structură.

Capitolul de față este consacrat prezentării principalelor proprietăți ale proteinelor. Vom descrie mai întîi metodele

Scanned with OKEN Scanner

folosite pentru izolarea și studierea proteinelor și vom enumera tipurile de proteine existente în organismele vii, după care vom analiza mai amănunțit proteinele enzimatice și mai ales importanța lor pentru metabolismul celular; vom descrie modul de localizare a unor enzime în anumite structuri subcelulare și, în sfîrșit, vom vedea care este gradul de stabilitate a proteinelor celulare. Problema structurii proteinelor și a sintezei lor va fi abordată în capitolele următoare.

METODE FOLOSITE PENTRU IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA PROTEINELOR

Prima etapă în studiul proteinelor constă în izolarea și purificarea lor. Întrucît proteinele sînt structuri delicate, fragile, efectuarea acestor operații se dovedește adeseori dificilă; nu se poate însă concepe realizarea unor progrese importante fără cunoașterea anumitor proprietăți ale substanțelor existente în celule. Acest lucru este valabil în egală măsură pentru enzime și pentru alte proteine. O asemenea analiză constituie premisa necesară pentru cercetarea rolului pe care proteinele astfel identificate îl joacă în economia celulei.

În cazul anumitor proteine se pot obține ușor preparate practic lipsite total de impurități. Dacă sîngele recoltat pe un anticoagulant este centrifugat, globulele roșii se depun. Plasma supernatantă, precum și stratul subțire de globule albe care se depun deasupra hematiilor pot fi îndepărtate cu ajutorul unei pipete și înlocuite cu soluție clorurată izotonică (definiția termenilor izotonic, hipertonic și hipotonic este dată în anexa 5). Globulele roșii sînt apoi resuspendate și centrifugate din nou. După cîteva asemenea spălări se obține un sediment de celule eliberate de plasma cu care erau amestecate. Dacă se adaugă acum apă distilată, globulele roșii se umflă datorită osmozei și în scurt timp plesnesc, eliberînd conținutul lor în lichidul înconjurător. Învelișurile hematiilor („fantome") și resturile celulare pot fi separate prin centrifugare la turații înalte. Întrucît conținutul globulelor roșii este reprezentat în cea mai mare parte de hemoglobină, supernatantul va consta practic dintr-o soluție de hemoglobină care, prin procedee adecvate, poate fi obținută în stare cristalizată. În felul acesta se pot

Scanned with OKEN Scanner

obţine cantităţi considerabile de hemoglobină cu un înalt grad de puritate.

În cazul majorităţii proteinelor însă, realizarea unor astfel de preparate este foarte dificilă. În cursul operaţiilor de purificare a hemoglobinei descrise mai sus, am văzut că din sîngele centrifugat a fost îndepărtat supernatantul — plasma. Se ştie de mult că în plasmă se găsesc mai multe proteine diferite, dat fiind că după adăugarea de sulfat de amoniu pînă la obţinerea unei soluţii semisaturate nu precipită decît aproximativ jumătate din totalul cantităţii de proteine: această fracţiune conţine globulinele. Cînd soluţia de sulfat de amoniu este pe trei sferturi saturată, precipită fracţiunea albuminică. În felul acesta, cu ajutorul sulfatului de amoniu, putem separa deci din plasmă mai multe fracţiuni proteice: fiecare dintre aceste fracţiuni conţine totuşi mai multe proteine diferite şi, pentru ca ele să fie obţinute în stare pură din aceste amestecuri, trebuie folosite alte tehnici suplimentare de separare şi purificare.

În acest scop, Cohn a folosit concentraţii diferite de alcool etilic; metoda lui constă în adăugarea de alcool absolut peste plasma răcită la 0°C sau chiar la temperaturi mai coborîte, amestecul fiind agitat continuu şi menţinut în condiţii de *p*H şi concentraţie salină riguros controlate. Diferitele proteine precipită una după alta datorită deosebirilor lor de solubilitate la diverse concentraţii de alcool; fibrinogenul, de exemplu, precipită la o concentraţie de alcool mai mică de 10%. Chiar şi în aceste condiţii însă, unele dintre fracţiunile obţinute nu sînt suficient de omogene, ceea ce impune folosirea unor metode bazate pe alte principii decît cel al precipitării fracţionate.

Una dintre metodele care au fost utilizate pentru purificarea proteinelor cu moleculă mică se bazează pe gradul de adsorbţie diferit al diverselor proteine pe particulele unor pulberi sau pe faza solidă a unor geluri. Soluţia proteică eterogenă este fie trecută printr-un tub umplut cu pulberea sau gelul respectiv (cromatografie), fie amestecată cu pulberea absorbantă, care este apoi sedimentată prin centrifugare. Proteinele mai puţin intens adsorbite pot fi uşor îndepărtate prin spălare, în timp ce proteinele care au fost adsorbite mai puternic sînt eluate final prin spălare prelungită. Tehnicile de acest fel, în special cele în care se utilizează coloanele de celuloză, s-au dovedit utile pentru separarea proteinelor cu moleculă mică

Scanned with OKEN Scanner

și a unor fragmente de proteine, aminoacizi și peptide. Cu unele excepții, ele sînt mai puțin utile în separarea proteinelor cu moleculă mare, cum sînt cele ce se găsesc în plasmă.

Într-o soluție tampon la un anumit pH, proteinele se vor găsi în stare ionizată, purtînd pe ele un număr de grupări cu încărcătură electrică, în special grupările $-COO^-$ și $-NH_3^+$ ale aminoacizilor. La orice valoare de pH, cu excepția uneia singure — punctul izoelectric —aceste sarcini nu se vor neutraliza reciproc, ceea ce va face ca molecula întreagă să posede o anumită încărcătură liberă (vezi cap. 3 și anexa 2. Noțiunile de pH și pK, soluție tampon și punct izoelectric sînt definite în aceeași anexă). Dacă între doi electrozi dispuși la o oarecare distanță într-o soluție de proteină se creează o diferență de potențial, moleculele proteice se vor îndrepta fie către anod, fie către catod. În soluțiile tampon folosite de obicei, încărcătura electrică liberă a majorității proteinelor va fi negativă și, în consecință, ele se vor îndrepta spre anod. Viteza lor de deplasare va depinde de mărimea moleculelor lor, de încărcătura lor electrică liberă și de o serie de alți factori. Astfel, dacă experiența se efectuează cu un amestec de proteine, se va putea obține, lucrînd în condiții adecvate, separarea acestor proteine în funcție de mărime și de sarcina lor electrică. Această metodă poartă numele de electroforeză.

În aparatul Tiselius se aplică o diferență de potențial de-a curmezișul nivelului de separație dintre soluția conținînd proteinele și o soluție tampon lipsită de proteină (electroforeza liberă, în coloană de lichid*). În fig. 2.1. este redată imaginea separării prin această tehnică a proteinelor plasmatice. Într-o altă variantă a electroforezei, se așază o picătură din soluția de proteine pe un anumit suport, cum ar fi o fîșie de hîrtie de filtru îmbibată cu soluție tampon: după pornirea curentului, moleculele de proteină vor părăsi locul de aplicare și se vor deplasa prin soluția tampon din hîrtie către unul din electrozi, cu o viteză care depinde în mare măsură de încărcătura lor liberă. Metoda poartă numele de *electroforeză de zonă*. După ce s-a obținut o separare suficientă a proteinelor, hîrtia poate fi scoasă din aparat și colorată, de exemplu, cu negru de naftalen (fig. 2.2.); metoda mai poate fi utilizată și în scop

* În limba engleză, *moving boundary electrophoresis* = electroforeză cu deplasare a nivelului de separație. — *N.T.*

Scanned with OKEN Scanner

preparativ; se decupează zonele conținînd anumite proteine și acestea din urmă sînt apoi eluate de pe hîrtie. Aparatul Tiselius nu poate fi utilizat în scopuri preparative; pentru aceasta au fost însă elaborate alte metode de electroforeză, în

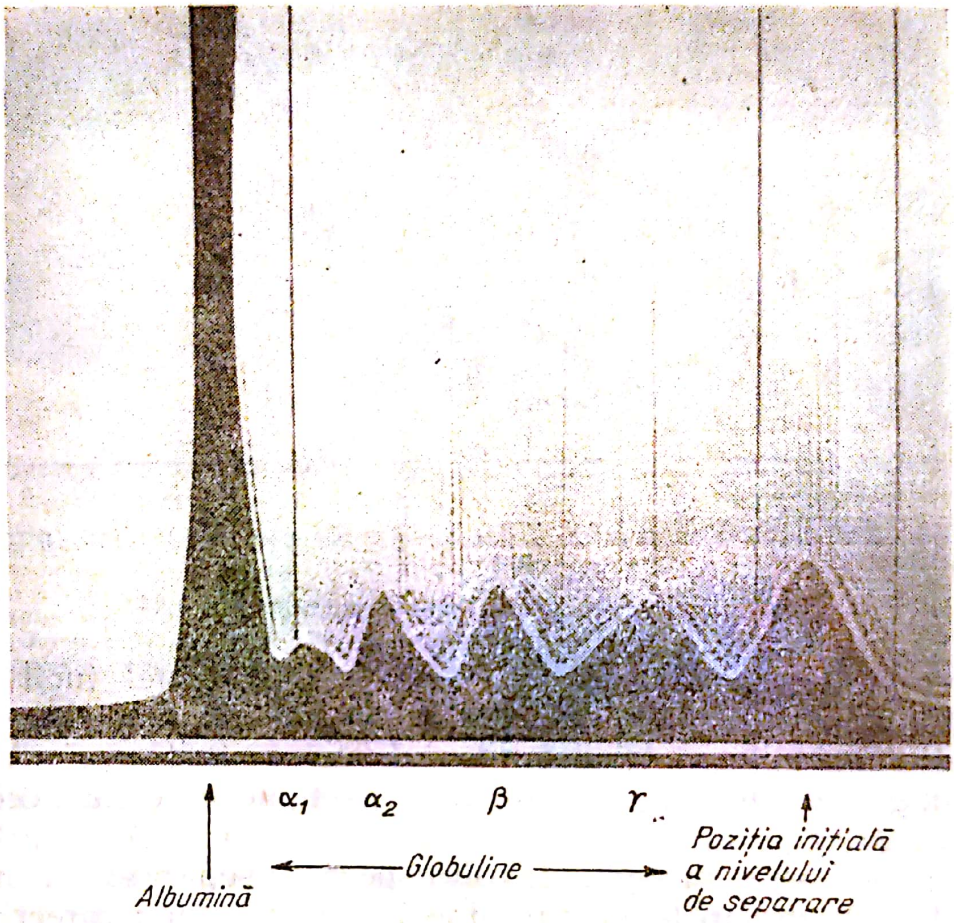


Fig. 2.1. Separarea unora dintre proteinele plasmei umane prin electroforeza liberă în coloană (Tiselius).

Limita de separare formată de fiecare componentă este pusă în evidență prin modificarea corespunzătoare a indicelui de refracție (după Williams, 1960).

unele dintre ele realizîndu-se scurgerea continuă a amestecului de proteine și colectarea diferitelor proteine pe măsura separării lor.

Atît electroforeza liberă în coloană, cît și cea de zonă reușesc să separe globulinele plasmatice cu mult mai multă eficiență decît metodele de precipitare cu sulfat de amoniu sau cu alcool. În cursul electroforezei, proteinele nu suferă nici o denaturare sau modificare a structurii lor.

Scanned with OKEN Scanner

Una dintre perfecţionările aduse electroforezei de zonă a constat în folosirea drept suport, în locul hîrtiei, a unui gel preparat dintr-un tampon adecvat şi amidon hidrolizat. Interstiţiile gelului de amidon sînt suficient de fine pentru a întîrzia

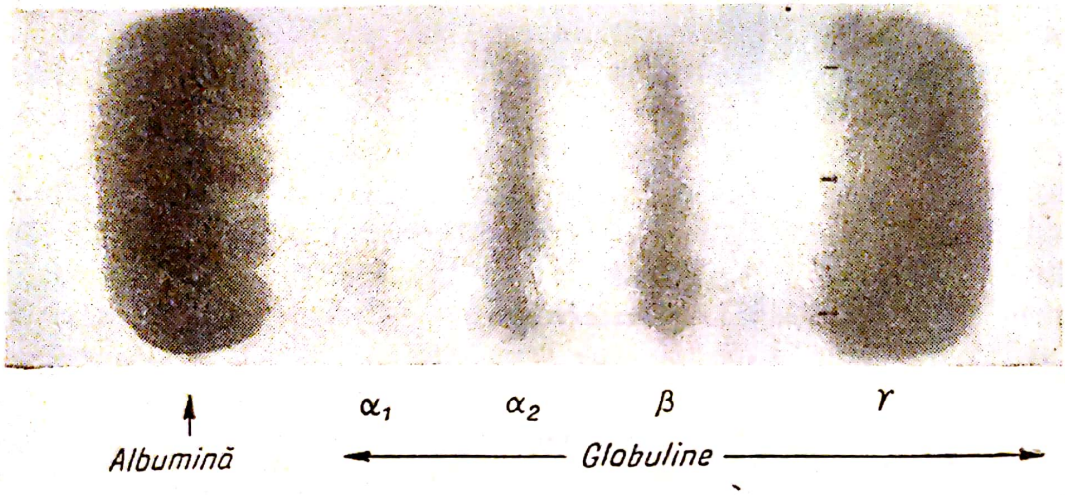


Fig. 2.2. Separarea unora dintre proteinele plasmei umane prin electroforeza de zonă.
Proteinele au fost colorate după oprirea migrării (după Harrison, 1957).

deplasarea moleculelor proteice mari, astfel încît, în această tehnică, separarea proteinelor depinde în mai mare măsură de dimensiunile moleculelor lor. În felul acesta, prin electroforeza în gel de amidon pot fi separate proteine care au aceeaşi sarcină electrică.

O altă metodă folosită pentru separarea componentelor din amestecurile de proteine în funcţie (mai direct) de dimensiunile moleculelor proteice în cauză este centrifugarea. Această tehnică constă în supunerea recipientelor ce conţin soluţiile de proteine unei mişcări de rotaţie foarte rapide, care generează forţe de sedimentare de zeci sau chiar sute de mii de ori mai mari decît forţa gravitaţiei. Dat fiind că viteza cu care sedimentează proteinele depinde în parte de greutatea lor moleculară (şi în parte de forma şi gradul lor de hidratare), metoda poate fi folosită atît pentru o evaluare a greutăţii moleculare, cît şi pentru obţinerea unor preparate omogene de proteine.

După utilizarea acestui arsenal de tehnici în cazul unui produs cum este plasma sanguină, trebuie să ne punem întrebarea care este gradul de separare pe care l-am putut realiza? În ce măsură, de exemplu, putem reuşi să obţinem fracţiuni

Scanned with OKEN Scanner

globulinice omogene? Rezultatele arată că fracţiunile globulinice chiar şi cele separate prin electroforeză, sînt totuşi amestecuri, întrucît dacă se inoculează una dintre aceste fracţiuni unui animal de experienţă se vor forma mai multe feluri de anticorpi, ceea

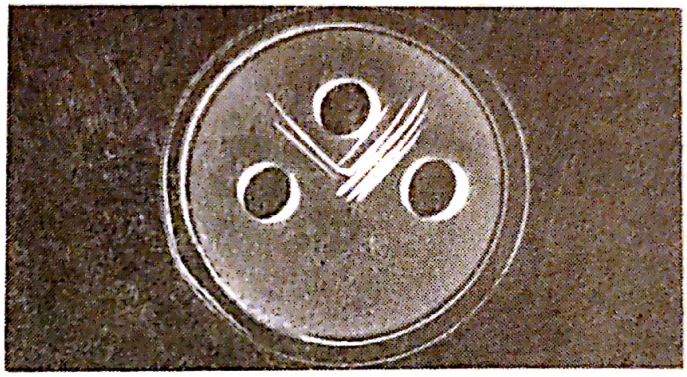


Fig. 2.3. Identificarea fracţiunilor proteice din plasma umană cu ajutorul tehnicii lui Ouchterlony de difuziune în gel de agar.

În godeul săpat în agar în partea stîngă a plăcii s-a introdus ser de om, cel din mijloc conţine ser de cal antiser de om iar în godeul din dreapta se găsesc γ—globuline purificate din plasmă umană. Diversele proteine au difuzat prin gel cu viteze diferite, iar în zonele în care antigenul s-a întîlnit cu anticorpul corespunzător s-a format o linie de precipitare cu aspect lăptos. Reacţiile dintre serul de om şi anticorpii din serul de cal au dus la formarea unui mare număr de linii constituite din precipitate antigen-anticorp. γ—globulinele purificate duc la formarea a numai cîteva linii (după Williams, 1960).

ce arată că în fracţiunea respectivă trebuie să fi existat mai multe proteine antigenic diferite. Tehnicile de difuziune în gel ale lui Oudin şi Ouchterlony demonstrează aceasta în mod evident. Într-o placă Petri cu geloză (gel de agar), ca acelea folosite curent în bacteriologie, se decupează adînciturі prin scoaterea unor rondele din stratul de agar; într-una din ele se introduce fracţiunea proteică folosită ca antigen, într-alta antiserul, adică serul obţinut prin injectarea acelui antigen unui animal adecvat acestui scop. Atît antigenul, cît şi anticorpul vor difuza în agar, iar în locul în care se vor întîlni vor reacţiona unul cu celălalt, dînd naştere unui precipitat. Dacă antigenul este omogen, va apărea de obicei o singură linie de precipitare; dacă în eşantionul testat există mai multe proteine, vor apărea două sau mai multe linii de precipitare (fig. 2.3). Această metodă este deosebit de sensibilă pentru detectarea componentelor proteice dintr-un amestec, în special cînd este combinată cu electroforeza. Tipul de imagine obţinut prin imunoelectroforeză este redat în fig. 2.4.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultă deci că metodele fizico-chimice nu reușesc întotdeauna să realizeze o separare mulțumitoare a proteinelor și că, atunci cînd avem de-a face cu amestecuri atît de complexe ca globulinele, trebuie să ne adresăm în mod suplimentar unei

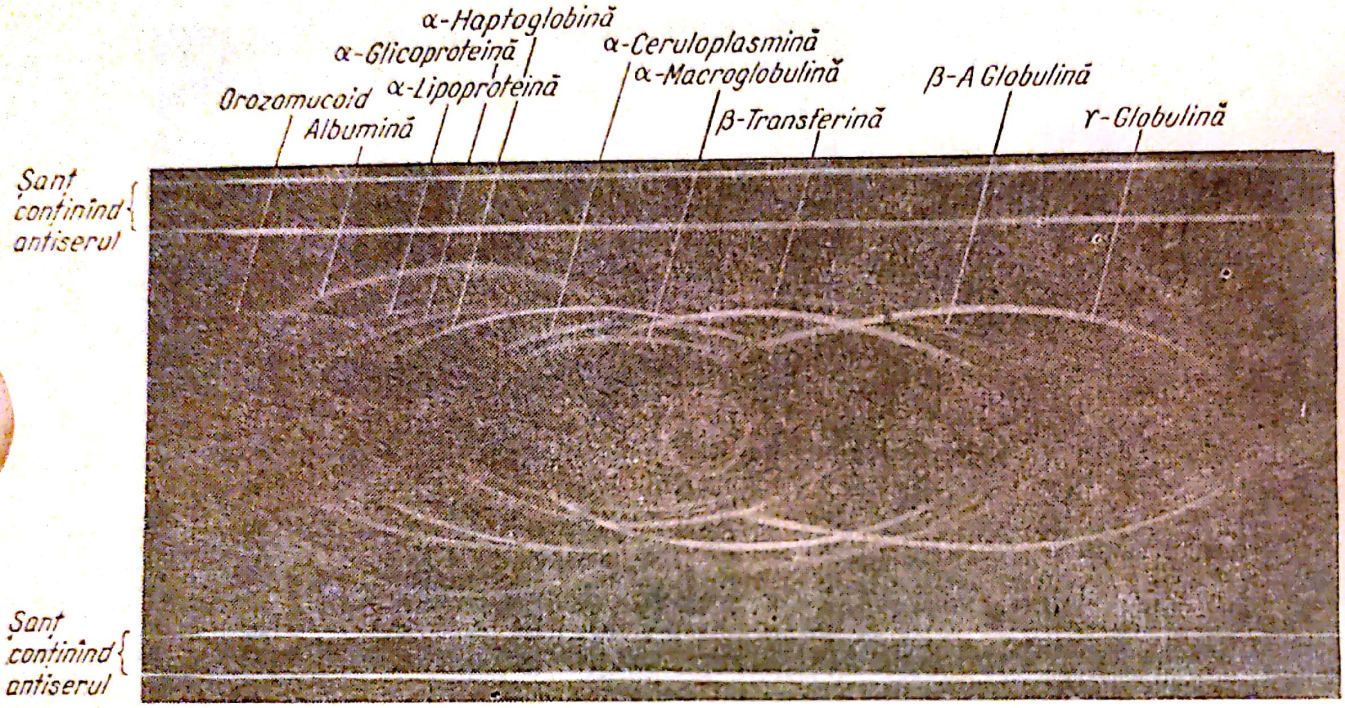


Fig. 2.4. Identificarea fracțiunilor de proteine din plasma umană cu ajutorul imunoelectroforezei.

În gelul de agar au fost săpate șanțuri longitudinale, ce se văd în partea superioară și inferioară a imaginii; ele conțin antiserul de cal. O probă de proteine plasmatice umane, supusă electroforezei în gel, a migrat de la dreapta spre stînga. Fracțiunile proteice separate prin electroforeză au fost identificate imunologic prin liniile de precipitare antigen-anticorp formate (după Williams, 1960).

metode biologice pentru a diferenția unele dintre proteinele componente ale unui astfel de amestec. Unii cercetători au pus chiar problema dacă noțiunea de puritate chimică are vreun sens în cazul macromoleculelor de proteină; ei consideră că în cazul fiecărei proteine putem vorbi de o compoziție și o structură moleculară medie, dar că se întîlnesc variații importante în jurul acestei medii. Vom vedea în cap. 3 că există totuși indicii că proteinele *au* o alcătuire precisă și că omogenitatea chimică este o realitate chiar și în cazul acestor molecule mari.

Pînă acum am discutat despre separarea proteinelor care se află în natură sub forma unor suspensii apoase (plasma). În cercetarea proteinelor intracelulare ne lovim în plus de greu-

Scanned with OKEN Scanner

tăți generate de extragerea lor din structurile și compartimentele celulei și trebuie să ținem totdeauna seama că există riscul producerii unor modificări ale proprietăților proteinelor în cursul extracției.

Multe din proteinele prezente în țesuturile vii, probabil chiar majoritatea lor, sînt enzime: restul au alte funcții, de exemplu, cea de schelet structural. În tabelul 2.1 sînt grupate o serie de proteine, dîndu-se și unele indicații asupra rolului pe care îl joacă în organismele vii. Această enumerare nu are pretenția de a fi nici sistematică, nici completă, fiind menită doar să scoată în evidență marea varietate a proteinelor existente în natură. Activitatea biologică este în funcție de structura moleculară a fiecărei proteine în parte.

TABELUL 2.1

Unele proteine și peptide cu importanță biologică

(Proteinele înscrise în tabel ca hemoglobină, serumalbumină, insulină etc. prezintă deosebiri minore de structură și proprietăți între diverse specii și chiar între diferite grupuri de indivizi din cadrul aceleiași specii. Ele nu reprezintă deci o singură proteină, ci o clasă de proteine cu proprietăți foarte asemănătoare. Proteinele pure trebuie definite mai precis, de exemplu, insulină de bou, hemoglobină umană normală, de tip adult).

Enzime	Enzime hidrolitice, de ex. enzimele proteolitice și alte enzime digestive: Enzime de transfer, de ex. transaminazele; Oxidaze și enzimele sistemelor dehidrogenazice; Enzime cu alte activități specifice.
Proteine structurale	Cheratinele, de ex. proteinele din păr, lînă și pene; Colagenul — fibrele țesutului conjunctiv; Mătasea; Proteinele musculare, de ex. actina și miozina; Proteinele din fusul mitotic; Proteinele din cili și flageli.
Proteine respiratorii	Hemoglobina; Citocromii; Mioglobina; Hemocianina și alte proteine respiratorii întîlnite la nevertebrate.
Proteine din plasma sanguină și din limfă	Serumalbumina; Globuline — un complex ce conține foarte multe proteine; Fibrinogenul — convertit în fibrină în procesul de coagulare a sîngelui.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 2.1 (continuare)

Anticorpi	Proteine formate ca răspuns la antigene. Acestea reprezintă o componentă importantă a fracțiunii globulinice din sînge.
Proteine și peptide toxice	Veninuri de șerpi; Toxine bacteriene; Toxine fungice.
Proteine și peptide hormonale	Hormonii hipofizei anterioare, de ex. ACTH; Hormonii hipofizei posterioare — vasopresina și ocitocina; Hormonii gastrointestinali, de ex. secretina; Hormonul paratiroidian; Tireoglobulina; Insulina; Glucagonul.
Proteinele din lapte	Cazeina: β—lactoglobulina.
Proteinele din ou	Vitelina și alte proteine din gălbenuș; Ovalbumina și alte proteine din albuș.
Proteine caracteristice plantelor și semințelor	Prolamine; Gluteline.
Nucleoproteine (proteine asociate cu acizi nucleici)	Proteine cromozomiale — protamine, histone; Proteine ribozomale; Proteine virale.
Alte proteine conjugate	Lipoproteine (proteine conjugate cu lipide, de ex. β—lipoproteina plasmatică); Glicoproteine (proteine conjugate cu hidrocarbonate, de ex. anumite proteine din membranele celulare); Fosfoproteine (proteine ce conțin fosfor, de ex. cazeina); Numeroase proteine conjugate se găsesc trecute la alte rubrici ale acestui tabel.
Alte proteine	Proteine ce nu au putut fi identificate pînă în prezent decît prin tehnici imunologice.

ROLUL ENZIMELOR ÎN METABOLISM

În tabelul 2.1. totalitatea enzimelor a fost clasificată în numai patru grupe, deși, după cum am menționat mai sus, această clasă de compuși cuprinde proteine de cea mai mare

Scanned with OKEN Scanner

diversitate și importanță. După Dixon și Webb, „Viața depinde de o rețea complexă de reacții chimice realizate de enzime specifice" sau, după cum s-a exprimat Borek, „Trăim pentru că avem enzime. Tot ceea ce facem — mersul, gîndirea, citirea acestor rînduri — se realizează printr-un anumit proces enzimatic". De aceea, vom discuta pe scurt rolul enzimelor în activitatea metabolică a celulei.

După cum am văzut, enzimele pot fi obținute sub formă de cristale de proteină, complet sau aproape complet lipsite de impurități. Pentru a cerceta specificitatea unei enzime sau viteza ei de reacție cu substratul, este deosebit de important să se lucreze cu un preparat purificat. După ce am studiat pe această cale proprietățile enzimelor izolate, putem trece la cercetarea modului lor de interacțiune în celulă ; într-adevăr, în organismul viu fiecare enzimă ocupă un loc anumit în cadrul unei serii de enzime care catalizează un lanț de reacții coordonate, a căror totalitate se exprimă printr-o anumită activitate metabolică. Spre exemplu, descompunerea glucozei pînă la CO_2 și H_2O presupune activitatea unui mare număr de enzime, capul seriei respective fiind hexochinaza : aceasta catalizează transferul unei grupări fosfatice de la adenozintrifosfat (ATP) la glucoză, cu producere de adenozindifosfat (ADP) și glucozo-6-fosfat :

$$\text{ATP} + \text{glucoză} \xrightarrow{\text{hexochinază}} \text{ADP} + \text{glucozo-6-fosfat.}$$

Pentru realizarea stadiilor ulterioare ale reacției globale, sînt necesare numeroase alte enzime cu diferite specificități, substanța hidrocarbonată originală trebuind să treacă printr-un mare număr de etape înainte de desfacerea ei completă pînă la CO_2 și H_2O. În cursul metabolizării ei, glucoza poate urma mai multe căi, în fiecare dintre acestea intervenind o serie de enzime mai mult sau mai puțin bine identificate.

Energia rezultată din oxidare este pusă la dispoziția celulei în cea mai mare parte sub forma unei acumulări de ATP. Scindarea acestui compus fosfatic macroergic (bogat în energie) în ADP și fosfat anorganic pune în libertate energie, care poate fi utilizată pentru contracția musculară, transportul activ de substanțe sau în alte activități metabolice. Acest mecanism al transferului de energie de către compușii fosfatici macroergici constituie o trăsătură fundamentală caracteristică a metabolismului animalelor, plantelor și bacteriilor.

Scanned with OKEN Scanner

Unul dintre produşii intermediari ai oxidării glucozei este acetil-coenzima A. Aceasta este în acelaşi timp şi un compus intermediar în cursul scindării şi sintezei acizilor graşi şi constituie una dintre căile pe care sistemele implicate în metabolismul hidrocarbonatelor sînt interconectate cu cele ce intervin în metabolismul grăsimilor. Alte asemenea conexiuni leagă aceste două sisteme de cele ale metabolismului proteinelor. Datorită întretăierii multiplelor căi metabolice, celula poate fi considerată drept un sistem multienzimatic unic şi foarte complex, în care nici o activitate anabolică sau catabolică nu se desfăşoară izolat.

SITUAREA ENZIMELOR ÎN CELULĂ

Am văzut că în cursul metabolizării glucozei se produce acetil-coenzima A. În celulă, acest compus este oxidat prin intermediul unei serii complexe de reacţii cunoscute sub numele de ciclul acizilor tricarboxilici; fiecare etapă din acest ciclu este catalizată de cîte o enzimă specifică (fig. 2.5). Deplasarea electronilor de-a lungul lanţului de transportori afectat reacţiilor de oxidare ale acestui ciclu, precum şi scindarea acizilor graşi sînt cuplate cu fosforilarea ADP în ATP (cap. 6). În condiţii de aerobioză, acestea sînt reacţiile cărora li se datoreşte în cea mai mare măsură producerea de ATP, necesar pentru contracţia musculară şi pentru desfăşurarea reacţiilor metabolice care necesită energie. Green a emis în 1947 ipoteza că enzimele răspunzătoare de aceste reacţii nu ar fi răspîndite la întîmplare în citoplasma celulară, ci s-ar găsi aici sub forma unor unităţi integrate. Aceste complexe ar conţine cantităţi relativ constante de enzime ale ciclului acizilor tricarboxilici, coenzimele necesare şi enzimele căii metabolice de fosforilare oxidativă, cu rol în regenerarea coenzimelor ciclului şi în fosforilarea ADP în ATP. Green a dat acestui complex denumirea de *sistem cicloforazic*.

Aceste ipoteze amintesc studiile clasice de biochimie ale lui Keilin şi Hartree asupra particulelor extrase din celulele miocardului: aceste particule conţineau enzimele şi coenzimele care constituie sistemul citocromilor (calea metabolică de fosforilare oxidativă), datorită căruia hidrogenul rezultat din oxidarea hidrocarbonatelor poate fi legat de oxigenul molecular cu formare de apă.

Scanned with OKEN Scanner

Este evident că extinderea domeniului acestor cercetări asupra asocierii enzimelor şi cofactorilor sub formă de unităţi complexe în interiorul celulei a constituit un subiect de studiu foarte atrăgător. În ultima vreme, precizia metodei centrifugării

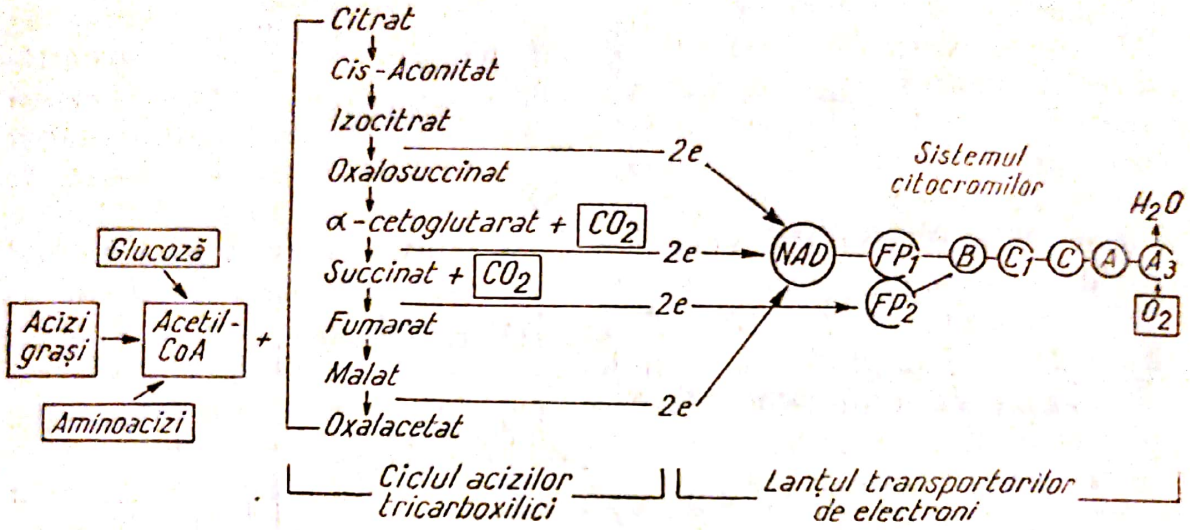


Fig. 2.5. Compuşii intermediari din ciclul acizilor tricarboxilici şi transportorii lanţului de transfer de electroni (sistemul citocromic) :

NAD = nicotinamidă-adenin-dinucleotid
FP = flavoproteină
B, *C* etc. = citocrom *b*, citocrom *c* etc.
(modificat după Lehninger, 1959).

diferenţiate a celulelor omogenizate a fost perfecţionată în aşa măsură, încît permite separarea diferitelor particule subcelulare — cum ar fi, de exemplu, mitocondriile — şi obţinerea lor în cantităţi suficient de mari pentru a îngădui studierea activităţii lor biochimice. În fig. 2.6 sînt ilustrate etapele succesive de lucru în cazul aplicării acestei metode la analizarea ţesutului hepatic. Structura mitocondriilor izolate pe această cale poate fi examinată la microscopul electronic. Pe preparate corect executate, ele au un aspect asemănător cu al mitocondriilor din secţiunile de celule hepatice fixate (fig. 5.12).

Cercetîndu-se activitatea biochimică a fracţiunii mitocondriale, s-a constatat că în aceste particule sînt localizate o mare parte din enzimele ciclului acizilor tricarboxilici şi ale sistemului citocromic. Într-adevăr, după centrifugarea diferenţiată a celulelor se constată că practic toată dehidrogenaza succinică — una dintre enzimele ciclului — şi toată citocromoxidaza din

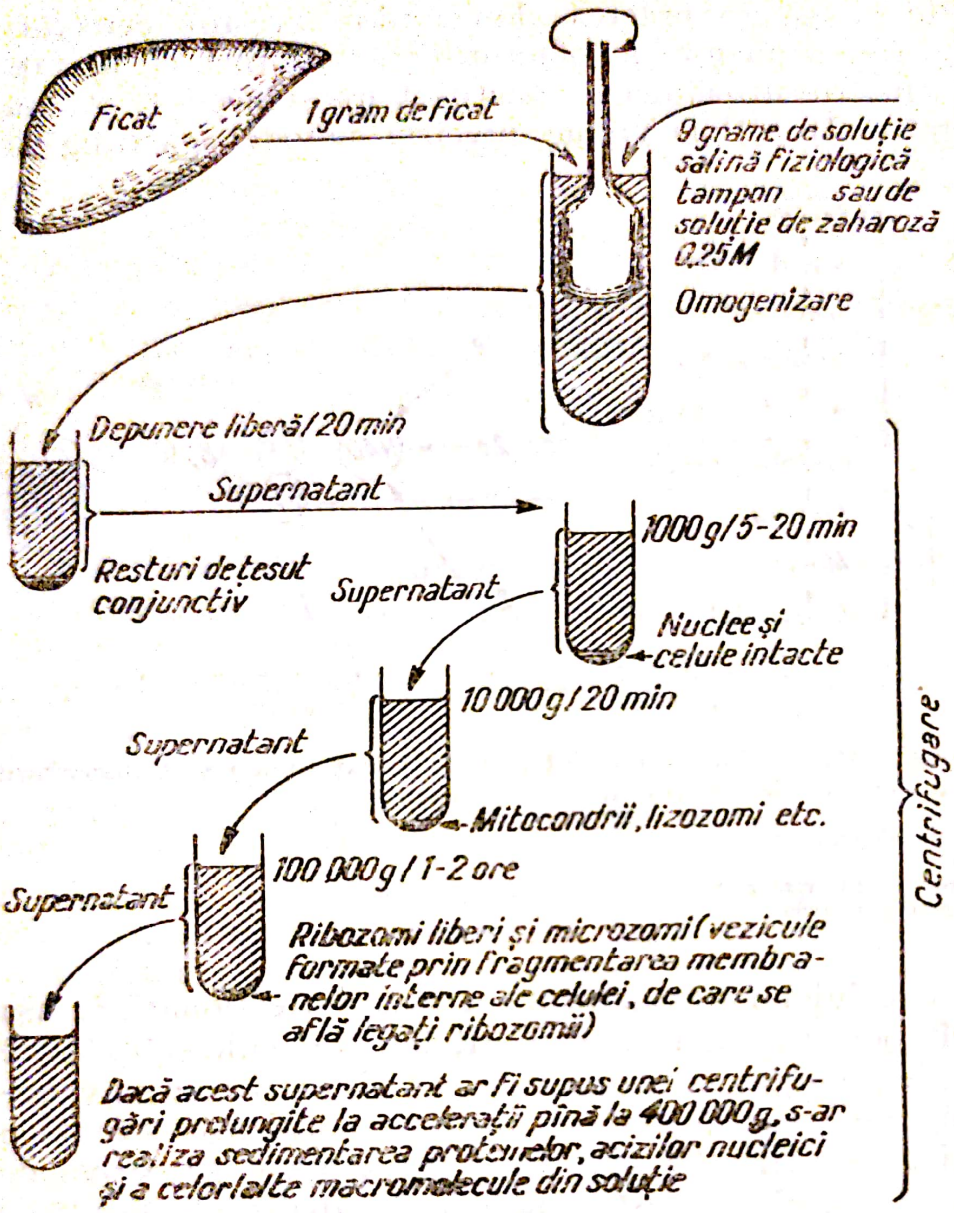


Fig. 2.6. Reprezentare schematică a principalelor etape în fracționarea componentelor celulare.

Țesutul este mai întîi omogenizat, celulele fiind dezagregate prin acțiunea forțelor de forfecare generate în omogenizator. Fibrele de țesut conjunctiv și alte detritusuri sedimentează de la sine prin lăsarea suspensiei în repaus. Lichidul ce se separă deasupra acestui sediment, adică supernatantul, este apoi centrifugat succesiv la turații tot mai mari. La o forță centrifugală de 1 000 de ori mai mare decît a gravitației se depun la fundul tubului nucleele și eventualele celule rămase intacte. La 10 000 *g* sînt sedimentate mitocondriile și lizozomii, iar la 100 000 *g* — ribozomii și microzomii.

celule sînt asociate cu fracțiunea mitocondrială. O parte din caracteristicile biochimice ale mitocondriilor corespund în mod evident cu cele ale sistemului cicloforazic postulat de Green.

Scanned with OKEN Scanner

Particulele cu activitate citocromoxidazică izolate de Hartree și Keilin își aveau originea în mitocondriile celulelor din miocard.

Dacă se constată că după centrifugare o anumită enzimă se regăsește cu predominanță, sau chiar în totalitate, asociată cu una din fracțiunile obținute, este probabil că elementele structurale corespunzătoare acestei fracțiuni conțineau enzima respectivă și în celula vie. Nu este totuși exclusă posibilitatea redistribuirii enzimei în cursul omogenizării. Cum putem dovedi că asocierea acestor sisteme enzimatice cu mitocondriile este o realitate și în cazul celulelor intacte, vii? O experiență a lui Holter aduce unele probe în acest sens. Se știa mai de mult că ouăle de arici de mare pot fi centrifugate întregi, fără ca aceasta să dăuneze dezvoltării lor ulterioare; conținutul lor se stratifică, granulele viteline, de exemplu, așezîndu-se în porțiunea superioară a celulei. O tehnică similară a fost folosită de Holter pentru separarea conținutului celulelor provenite de la o specie mare de amibă. Celulele astfel centrifugate rămîn viabile. Prin microdisecție, acest autor a tăiat apoi celulele în două, cercetînd conținutul în enzime al fiecărei jumătăți. Porțiunea în care se găsea stratul de mitocondrii prezenta activitate succinil-dehidrogenazică; în jumătatea în care lipseau mitocondriile, nu s-a semnalat o asemenea activitate. Același fapt a mai fost constatat și pe altă cale, cu totul diferită de cea arătată mai sus. În acest caz, tehnica respectivă se bazează pe descompunerea teluritului de sodiu în telur metalic în zonele celulare în care activează succinil-dehidrogenaza. De aceea, se examinează la microscopul electronic secțiuni ultrafine de țesuturi: telurul este opac pentru fasciculul de electroni și va permite astfel punerea în evidență a zonelor celulare în care se găsește enzima. Astfel, dehidrogenaza a putut fi localizată numai în mitocondrii.

Analiza ulterioară a potențialului biochimic al mitocondriilor a confirmat faptul că acestea conțin toate enzimele ciclului acizilor tricarboxilici și lanțul metabolic de fosforilare oxidativă asociat cu el, arătînd totodată că aceste particule intracelulare reprezintă sediul și al altor reacții metabolice, cum ar fi scindarea acizilor grași. Green a găsit că proporțiile relative în care se găsesc asociate diferitele enzime respiratorii sînt constante chiar și în fragmentele de mitocondrii, observație care consti-

Scanned with OKEN Scanner

tuie o dovadă în plus că aceste enzime sînt asociate într-un mod asemănător şi în mitocondriile intacte.

Diverse alte enzime pot fi regăsite cu precădere, după omogenizare, în supernatant sau în alte fracţiuni subcelulare. Astfel, apelînd tot la exemple din cadrul metabolismului glucidic, hexochinaza şi majoritatea enzimelor implicate în glicoliză se regăsesc, după centrifugarea celulelor dezintegrate, în special sau chiar în exclusivitate — în supernatant. Această constatare poate fi interpretată fie în sensul că aceste enzime sînt distribuite uniform în citoplasmă, fie că sînt legate *labil* de una din structurile celulei vii. Este de aşteptat ca studiile pe homogenate, de tipul celor descrise, să nu poată rezolva această problemă. Microzomii şi ribozomii, care sedimentează sub acţiunea unor forţe de ordinul a 100 000 *g* (fig. 2.6), intervin în sinteza proteică, ce va fi discutată în alte capitole.

Tabloul activităţii metabolice astfel conturat relevă faptul că anumite reacţii enzimatice se desfăşoară în special — sau chiar în exclusivitate — în asociaţie cu anumite organite celulare. Ne aflăm aici în zona de graniţă dintre biochimie şi analizarea structurii morfologice fine, unde procesele biochimice nu pot fi privite ca o simplă succesiune de reacţii enzimatice separate, ci numai prin prisma organizării structurale a enzimelor unei succesiuni de reacţii biochimice. Problema structurii detaliate a mitocondriilor va fi reluată în cap. 6.

STABILITATEA PROTEINELOR

În cap. 1 s-a descris aspectul microscopic al celulelor vii dintr-o cultură de ţesut. Majoritatea celulelor observate se află într-o stare de neîntreruptă activitate, cu membranele în continuă mişcare şi cu mitocondriile şi celelalte incluziuni celulare constant antrenate de curenţii citoplasmatici. Activitatea celulei nu se rezumă însă la ceea ce se poate vedea la microscop. Spre exemplu, energia necesară pentru a menţine concentraţia intracelulară a ionilor de sodiu la un nivel scăzut în comparaţie cu a mediului înconjurător este generată continuu prin activitate metabolică. Cu cît pătrundem mai adînc în analiza comportării biochimice a unei celule „în repaus", cu atît ne dăm mai bine seama că starea ei metabolică este dinamică, rezultat al unui

Scanned with OKEN Scanner

echilibru realizat prin activitatea continuă a unui număr mare de căi metabolice. Acest „echilibru dinamic al constituenților organismului" ni s-a dezvăluit cu deosebită pregnanță în momentul în care în biologie au început să fie utilizați izotopii: substanțele chimice marcate („etichetate") cu izotopi erau ușor urmărite în labirintul transformărilor suferite în organism, se putea studia dinamica încorporării lor în constituenții celulari, precum și stabilitatea acestor constituenți. Multe etape ale proceselor metabolice din celule au putut fi descoperite sau confirmate cu ajutorul substanțelor marcate cu izotopi. Astfel, de exemplu, poziția centrală pe care o ocupă acetatul, sub formă de acetil-coenzimă A, în scindarea atît a hidrocarbonatelor, cît și a grăsimilor, a fost confirmată utilizînd acetat marcat cu un izotop al carbonului, ^{14}C.

S-a arătat că, în celule, moleculele mici se găsesc într-un flux continuu. Grupările aminice, de exemplu, sînt permanent mutate de pe un aminoacid pe altul (transaminare). Grupările metilice și carboxilice au o soartă similară, fiind totodată transferate și la nucleotizi sau zaharuri (toate aceste reacții desfășurîndu-se sub control enzimatic). Proteinele celulare, în totalitatea moleculei lor, se află oare în afara acestor fluxuri metabolice?

Dacă unui animal i se administrează în hrană un aminoacid — ca glicina — marcat cu ^{15}N, mare parte din izotop este curînd excretată, o parte din grupările aminice fiind repede desprinse și convertite în uree. Dar nu tot azotul se elimină pe această cale: o parte din el este reținută în țesuturi, fiind excretată foarte lent. Forma sub care este reținut azotul poate fi determinată prin sacrificarea animalului peste cîteva zile. Majoritatea cantității de ^{15}N se regăsește încorporată în proteinele tisulare. Analiza acestora arată că aproximativ o treime din azotul marcat se găsește în resturile (radicalii) de glicină, celelalte două treimi fiind legate de alte resturi de aminoacizi, ca rezultat al transaminărilor. Este evident deci că s-a produs o încorporare a glicinei în proteine, probabil în cursul sintezei unor molecule proteice noi. Se știe că în glandele digestive se formează continuu proteine; mai mult decît atît, zilnic iau naștere celule noi, chiar în organismul adult. Aminoacidul marcat poate fi încorporat, de exemplu, în enzimele pancreatice, în hemoglobina din globulele roșii nou formate sau în celulele nou formate

Scanned with OKEN Scanner

din epiteliul stratificat al pielii sau din epiteliul intestinal, ale cărui celule sînt permanent descuamate și reînnoite la nivelul vîrfurilor vilozităților ce căptușesc intestinul.

Alte observații au arătat că hemoglobina marcată, o dată formată, rămîne neschimbată tot timpul vieții globulei roșii; la om, aceasta durează cca. 120 de zile. Se aplică oare această constatare tuturor proteinelor în care s-a încorporat glicină marcată? Dacă ar fi așa, ar însemna că orice încorporare de aminoacid marcat ar echivala cu formarea de proteină nouă care, o dată sintetizată, rămîne nemodificată tot restul vieții celulei. Există însă dovezi, provenind din numeroase surse, care arată că, spre deosebire de hemoglobină, multe proteine sînt continuu descompuse și resintetizate cu un ritm constant chiar în celulele nesecretorii și în cele care nu se divid. „Longevitatea" diverselor proteine este foarte diferită: colagenul o dată depus în tendoanele din coada unui șobolan rămîne acolo nemodificat perioade lungi de timp, poate chiar pentru tot restul vieții animalului, în timp ce numeroase proteine hepatice au o viață foarte scurtă, probabil de numai cîteva ore. Ritmul de reînnoire a proteinelor a fost determinat într-o serie de sisteme biologice diferite. Date dintre cele mai interesante au fost obținute prin studiul proteinelor enzimatice din mușchii de mamifer. Țesutul muscular este deosebit de adecvat pentru acest gen de experiențe, deoarece pot fi practic eliminate atît secreția extracelulară de proteine, cît și formarea de celule noi.

Simpson și Velick au injectat unor iepuri adulți un amestec de cinci aminoacizi, unul dintre ei marcat cu ^{35}S, ceilalți cu ^{14}C. Iepurii au fost sacrificați după 36 de ore, realizîndu-se preparate enzimatice din mușchii scheletici. S-au izolat și cristalizat aldolaza și gliceraldehida-3-fosfat-dehidrogenaza (enzime implicate în glicoliză), aminoacizii constituenți fiind separați prin hidroliză. Ambele enzime conțineau aminoacizi marcați. După cum am mai arătat, explicația cea mai plauzibilă a fenomenului constatat este că în decursul celor 36 de ore care s-au scurs între injectare și analizare s-au format molecule noi de proteină enzimatică. Cum însă cantitățile de enzime din mușchi se mențin relativ constante, rezultă că în acest caz, în aceeași perioadă de timp trebuie să se fi descompus un număr echivalent de molecule de enzimă. Astfel, sinteza și descompunerea continuă se compensează reciproc, dînd naștere

Scanned with OKEN Scanner

unui echilibru dinamic. Ritmul cu care se realizează aceste procese variază de la o enzimă la alta; în experienţele amintite, încorporarea specifică a aldolazei era de aproape două ori mai mare decît în cazul dehidrogenazei. Pe baza unor experienţe de acest tip s-a apreciat că cca. 1% din aldolază este reînnoită zilnic.

Mai există şi o altă explicaţie a acestor fenomene pe care nu am luat-o pînă acum în consideraţie: este posibil ca moleculele proteice să nu sufere o descompunere completă urmată de o resinteză pe seama rezervelor de aminoacizi din celulă, ci s-ar putea ca în moleculele individuale de proteină să se producă înlocuiri de aminoacizi, fără o degradare prealabilă. Aceasta ar presupune ruperea a două legături peptidice şi reconstituirea lanţului cu înlocuirea aminoacidului respectiv printr-un altul similar, de astă dată marcat, furnizat de rezervorul intracelular de aminoacizi. Există unele dovezi care arată că acest lucru se poate întîmpla, într-o măsură limitată, în unele sisteme biologice. Este puţin probabil însă ca acest proces să fi avut loc în experienţa cu aldolaza musculară, deoarece Simpson şi Velick au constatat că vitezele de înlocuire a celor cinci aminoacizi diferiţi din enzima respectivă erau egale. Fiecare aminoacid ocupă o poziţie diferită în lanţurile polipeptidice care alcătuiesc molecula. Este puţin probabil ca substituţia să ducă la asemenea rezultate, care concordă cu ceea ce ne-am aştepta să se întîmple dacă proteinele s-ar forma *de novo* din aminoacizi separaţi.

Într-un organism în stare de „repaus" are loc o sinteză continuă a majorităţii proteinelor. Ritmul de neoformare, respectiv de descompunere, în celulele care nu sînt în curs de creştere sau multiplicare şi care nu au o activitate secretorie este, la animalele superioare, ceva mai scăzut decît se credea înainte de introducerea tehnicilor cu izotopi: am văzut că zilnic se resintetizează aproximativ 1% dintr-o enzimă musculară. În schimb, ritmul de reînnoire într-o populaţie bacteriană de *Escherichia coli (E. coli)* care nu se multiplică poate ajunge la 5% pe oră.

Formarea unor compuşi cu activitate enzimatică trebuie să fi fost unul dintre evenimentele primordiale ale originii vieţii (anexa 6). După cum am văzut, aproape toate procesele caracteristice organismelor vii presupun desfăşurarea unor reacţii mijlocite de enzime. În celule, aceste reacţii sînt grupate între ele,

Scanned with OKEN Scanner

formînd sisteme cuplate care deservesc o serie de activităţi metabolice. Grupele de enzime împreună cu cofactorii corespunzători sînt localizate uneori în organite celulare.

Toate enzimele izolate şi identificate pînă acum s-au dovedit a fi proteine. Fiecare enzimă catalizează un număr limitat de reacţii, specificitatea acţiunii lor fiind dependentă de structura proteinei corespunzătoare. Printre foarte numeroasele proteine existente în toate celulele se află nu numai enzime, ci şi o diversitate de alte proteine, activitatea fiecăreia dintre ele fiind la rîndul ei dependentă de particularităţile structurii ei moleculare.

Va trebui să aflăm mai multe despre aceste substanţe deosebit de complexe şi de interesante. Este necesar, în special, să examinăm mai îndeaproape două aspecte importante: în primul rînd, care este tipul de structură moleculară ce permite alcătuirea unei game atît de largi de proteine cu activitate specifică; în al doilea rînd, care este mecanismul ce asigură, şi încă cu asemenea precizie, producerea proteinelor în celulă? Prima dintre aceste probleme va fi discutată în capitolul următor.

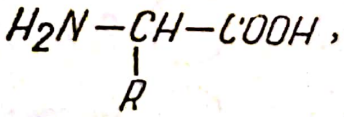
Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

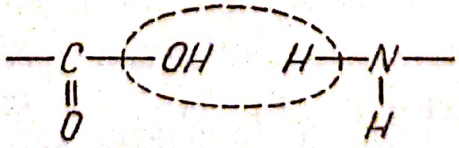
STRUCTURA MOLECULELOR PROTEICE MICI

STRUCTURA PRIMARĂ

Despre răspîndirea largă și rolurile variate ale proteinelor am vorbit în capitolul anterior. Vom lua acum în discuție structura moleculelor de proteină și modul în care această structură permite îndeplinirea unor funcții atît de variate. Proteinele sînt compuși cu greutate moleculară mare, alcătuiți cu precădere din aminoacizi legați între ei sub formă de lanțuri *polipeptidice*. Formula generală a unui aminoacid poate fi scrisă astfel:



în care R reprezintă diverse grupări chimice, cele mai des întîlnite în moleculele proteice fiind redate în tabelul 3.1 (pag.68,69). În alcătuirea unui lanț polipeptidic, aminoacizii sînt legați prin intermediul grupărilor —COOH și —NH_2, cu eliminarea unei molecule de apă pentru fiecare legătură:



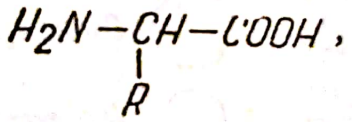
Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

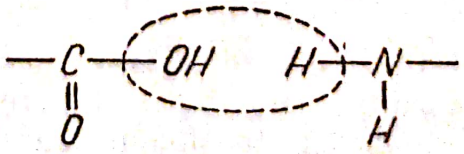
STRUCTURA MOLECULELOR PROTEICE MICI

STRUCTURA PRIMARĂ

Despre răspîndirea largă și rolurile variate ale proteinelor am vorbit în capitolul anterior. Vom lua acum în discuție structura moleculelor de proteină și modul în care această structură permite îndeplinirea unor funcții atît de variate. Proteinele sînt compuși cu greutate moleculară mare, alcătuiți cu precădere din aminoacizi legați între ei sub formă de lanțuri *polipeptidice*. Formula generală a unui aminoacid poate fi scrisă astfel:



în care R reprezintă diverse grupări chimice, cele mai des întîlnite în moleculele proteice fiind redate în tabelul 3.1 (pag.68,69). În alcătuirea unui lanț polipeptidic, aminoacizii sînt legați prin intermediul grupărilor —COOH și —NH_2, cu eliminarea unei molecule de apă pentru fiecare legătură:



Scanned with OKEN Scanner

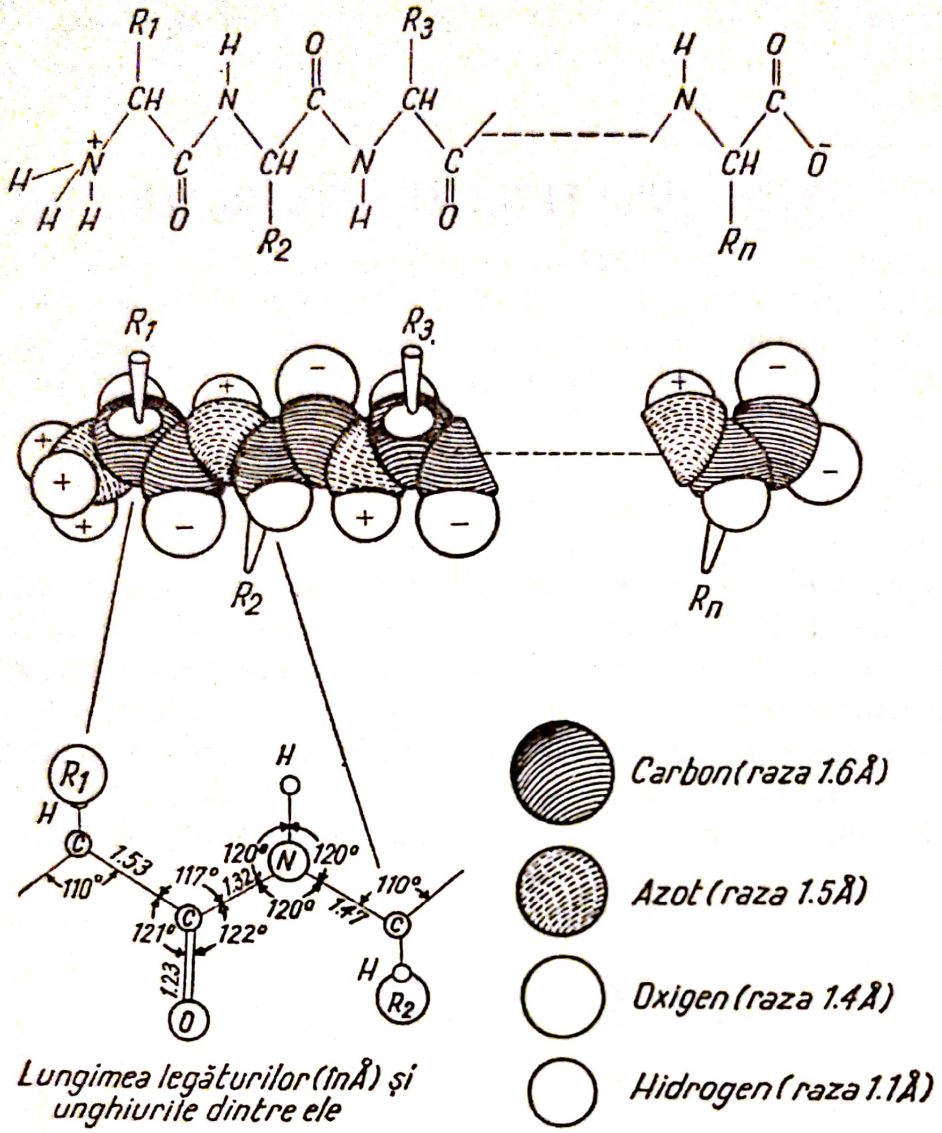


Fig. 3.1. Formula chimică și desenul unui model molecular al „coloanei axiale" a unui lanț peptidic. Punctele de fixare ale catenelor laterale (R_1, R_2 ... R_n) sînt reprezentate prin „țăruși".

Pentru obținerea unui model al unui lanț polipeptidic complet, pe fiecare dintre „țărușii" acestui model al structurii axiale trebuie înfipt unul sau altul din modelele de catene laterale cuprinse în tabelul 3.1. Modul convențional de haşurare adoptat în desenul de mai sus va fi păstrat fără modificări de-a lungul întregii cărți. Semnele + și − de pe modelul molecular reprezintă fracțiuni de sarcini de 1/3 pînă la 1/2 unități atomice (anexa 2). Desenul din partea de jos a figurii reprezintă lungimile legăturilor interatomice și unghiurile dintre ele $\left(1\ \text{Angström (Å)} = \frac{1}{10}\ \text{m}\mu;\ 1\ \text{m}\mu = \frac{1}{1\,000}\ \mu;\ 1\mu = \frac{1}{1\,000}\ \text{mm}\right)$.

În fig. 3.1 este redată *structura axială* („coloana vertebrală") a unui lanț polipeptidic, R_1, R_2 ... R_n reprezentînd *catenele laterale*. Porțiunea dintr-un aminoacid care a fost încorporată

Scanned with OKEN Scanner

într-un lanţ polipeptidic, adică acidul fără o moleculă de apă, poartă numele de rest de aminoacid.

Doi aminoacizi legaţi în acest mod formează un dipeptid, trei un tripeptid şi aşa mai departe. Lanţurile lungi poartă denumirea de polipeptide ; lanţurile scurte sînt denumite adeseori pur şi simplu peptide. Lanţurile peptidice de aproximativ 50 de resturi de aminoacizi (greutăţi moleculare ~6 000) sau agregatele formate din mai multe lanţuri, cu o greutate moleculară totală mai mare de 6 000, încep să prezinte proprietăţi diferenţiate, generate de complexitatea mai avansată a structurii lor, conferindu-le caracteristicile de proteine. Moleculele de proteină pot conţine de la 50 pînă la 5 000 sau mai multe resturi de aminoacizi. Lungimea lanţurilor individuale din care sînt alcătuite aceste molecule variază de la 20 la 600 sau mai multe resturi de aminoacizi. În structura globală a unei molecule proteice este inclusă adeseori, în afara lanţurilor ei peptidice, o componentă cu constituţie chimică diferită, cunoscută sub numele de grupare prostetică. Componenta hemică a hemoglobinei este un exemplu de asemenea grupare.

Proporţiile relative ale diferiţilor aminoacizi în diverse proteine sînt redate în tabelul 3.2 (pag.72,73). Din acest tabel reies următoarele trăsături generale valabile pentru multe din proteinele fibrilare şi pentru majoritatea proteinelor nefibrilare sau globulare : a) faţă de diversitatea marcată a proprietăţilor diferitelor proteine (cap. 2), variaţiile de compoziţie în aminoacizi sînt surprinzător de mici ; b) proporţia de catene laterale hidrocarbonice (catene laterale ce nu conţin decît atomi de carbon şi de hidrogen) variază în general între 30 şi 50% ; c) la pH ~ 7 numărul catenelor laterale cu încărcătură electrică pozitivă este apropiat de al celor cu încărcătură negativă, ceea ce face ca încărcătura liberă a moleculei de proteină să fie mult mai mică decît numărul total al grupărilor ionizabile. Aceste constatări generale nu sînt valabile în cazul mătăsii, colagenului, elastinei, cheratinei, salminei şi altor proteine sau în cel al histonelor. Proprietăţile speciale ale acestor proteine atipice provin din faptul că în structura lor anumite catene laterale sînt prezentate într-o proporţie foarte mare; vom amîna discutarea lor pînă la paragrafele corespunzătoare din cap. 4 şi 9.

În acest capitol ne vom concentra atenţia asupra acelor

Scanned with OKEN Scanner

proteine din tabelul 3.2 care nu prezintă particularități speciale din punctul de vedere al compoziției în aminoacizi (adică asupra proteinelor care nu au fost menționate în mod special în paragraful anterior). Cum pot oare molecule care au o compoziție globală atît de asemănătoare să dea naștere unei asemenea multitudini de enzime cu înaltă specificitate și să joace în celule roluri atît de variate? În ce măsură specificitatea rezidă în gruparea prostetică a unei proteine mai degrabă decît în lanțurile ei peptidice?

Cercetări recente asupra proteinelor au scos în evidență faptul că pentru a răspunde la aceste întrebări trebuie să cunoaștem mai multe despre o moleculă de proteină decît compoziția sa globală în aminoacizi. Se pare că în cazul unui preparat de proteină dat, de exemplu insulină de porc, suficient de bine-cunoscută și purificată, fiecare moleculă prezintă aceeași *secvență* de resturi de aminoacizi de-a lungul lanțurilor peptidice ce o compun și că detaliile acestei secvențe constituie factorul principal care determină structura și reacțiile moleculei de proteină.

Se poate stabili o analogie între secvențele resturilor de aminoacizi din proteine și succesiunile de litere dintr-o frază. Această analogie ne permite să înțelegem cum din numai 20 de aminoacizi diferiți este posibil să se formeze o mulțime practic infinită de secvențe și deci de proteine diferite, întrucît știm că, în limba engleză, spre exemplu, se poate forma o diversitate practic infinită de fraze folosind 26 de litere. Prin aceeași analogie se mai înțelege cum se pot forma proteine cu funcții foarte diferite fără a prezenta variații mari în proporția diferitelor resturi de aminoacizi, tot așa cum fraze cu înțelesuri foarte variate pot conține diversele litere în proporții aproximativ egale, dar aranjate în succesiuni diferite. Frecvența medie a diverselor resturi de aminoacizi din proteinele *E. coli* este comparată în fig. 3.2 cu frecvența cu care apar literele alfabetului în limba engleză scrisă. Unele resturi, ca cele de glicină, leucină și serină, par a fi sau disponibile în cantitate mare sau, ca și vocalele, mai necesare, fiind încorporate cu frecvență mai mare. Altele, ca triptofanul sau litera Z, spre exemplu, sînt utilizate numai ocazional.

În fig. 3.3—3.6 sînt redate secvențele de aminoacizi ale cîtorva din polipeptidele și proteinele naturale care au fost descifrate pînă în prezent din acest punct de vedere. Printre

Scanned with OKEN Scanner

acestea se află ocitocina, vasopresina și hormonul adrenocorticotrop (ACTH) — hormoni hipofizari — , insulina — o proteină hormonală, ribonucleaza — o enzimă, precum și proteina struc-

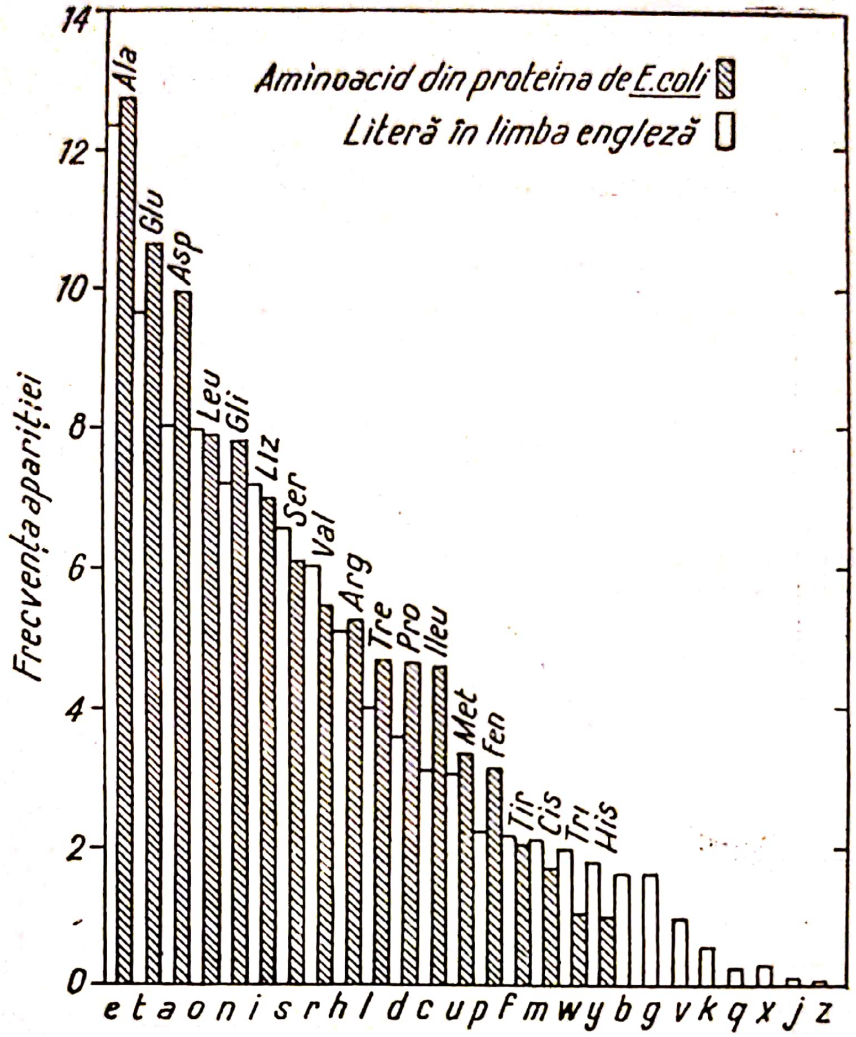


Fig. 3.2. Comparație între frecvența cu care sînt folosite diferitele litere ale alfabetului în limba engleză scrisă și frecvența cu care se întîlnesc diferitele resturi de aminoacizi în secvențele proteinelor din *E. coli* (după Morowitz, 1958).

turală a virusului mozaicului tutunului (VMT). Se cunoaște de asemenea o bună parte a secvențelor din mioglobină și hemoglobină, care sînt prezentate în cap. 11. Formulele insulinei, ribonucleazei și proteinei VMT, redate în fig. 3.4—3.6, reprezintă structura *primară* a acestor proteine. Justificarea introducerii acestui termen se va lămuri în paragrafele următoare, în care vor fi descrise și alte aspecte ale structurii proteinelor. Pînă în prezent, la proteinele globulare nu s-a putut pune în evidență

Scanned with OKEN Scanner

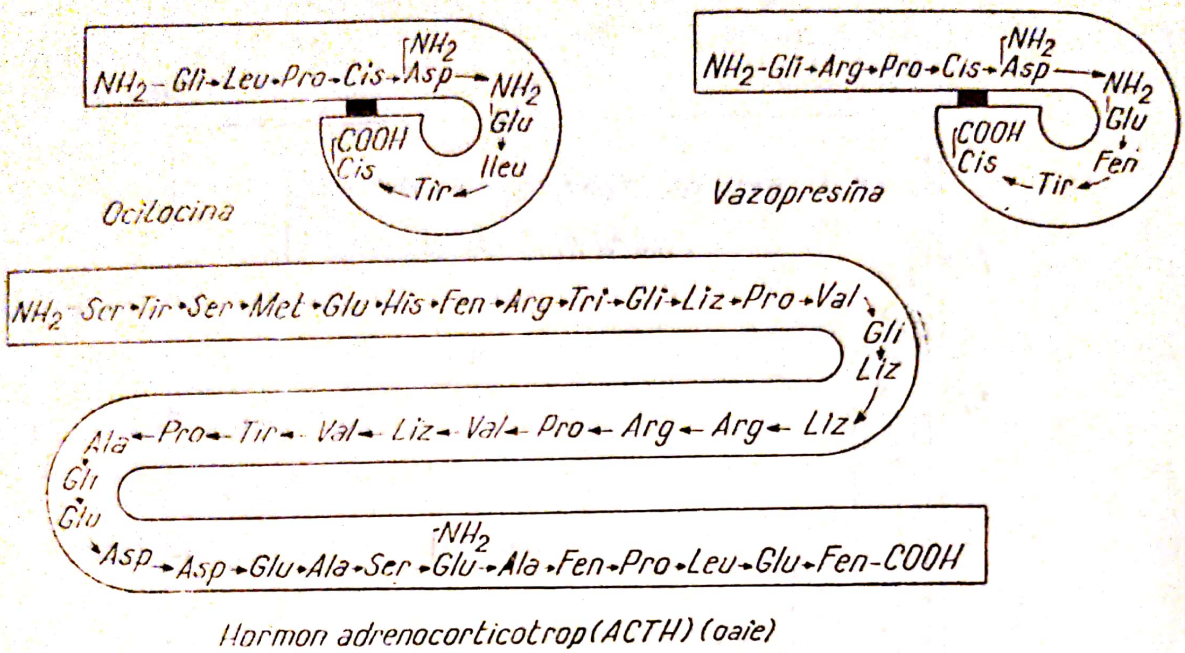


Fig. 3.3. Structura primară a hormonilor hipofizari: ocitocina, vazopresina și hormonul adrenocorticotrop (ACTH).

(Legăturile S—S din fig. 3.3 pînă la 3.5 sînt reprezentate printr-un „ciment" negru între două lanțuri sau între două porțiuni ale aceluiași lanț îndoit.)

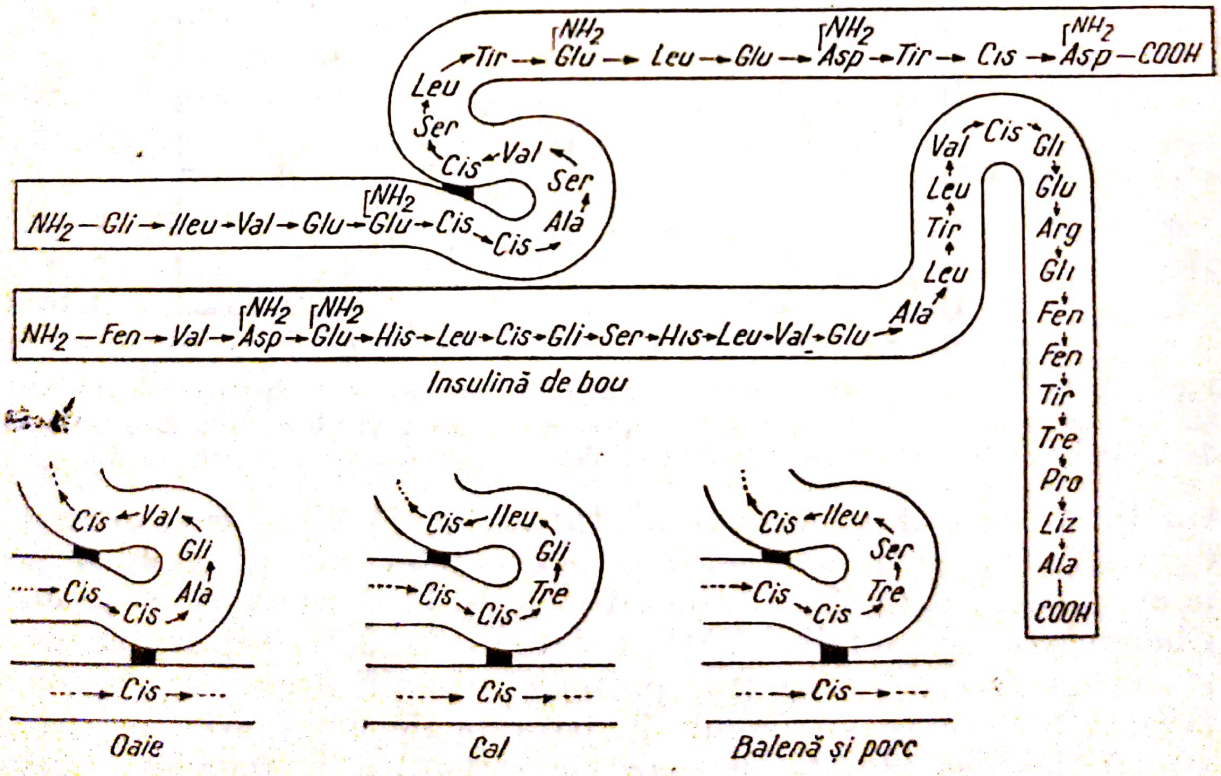


Fig. 3.4. Structura primară a insulinei.

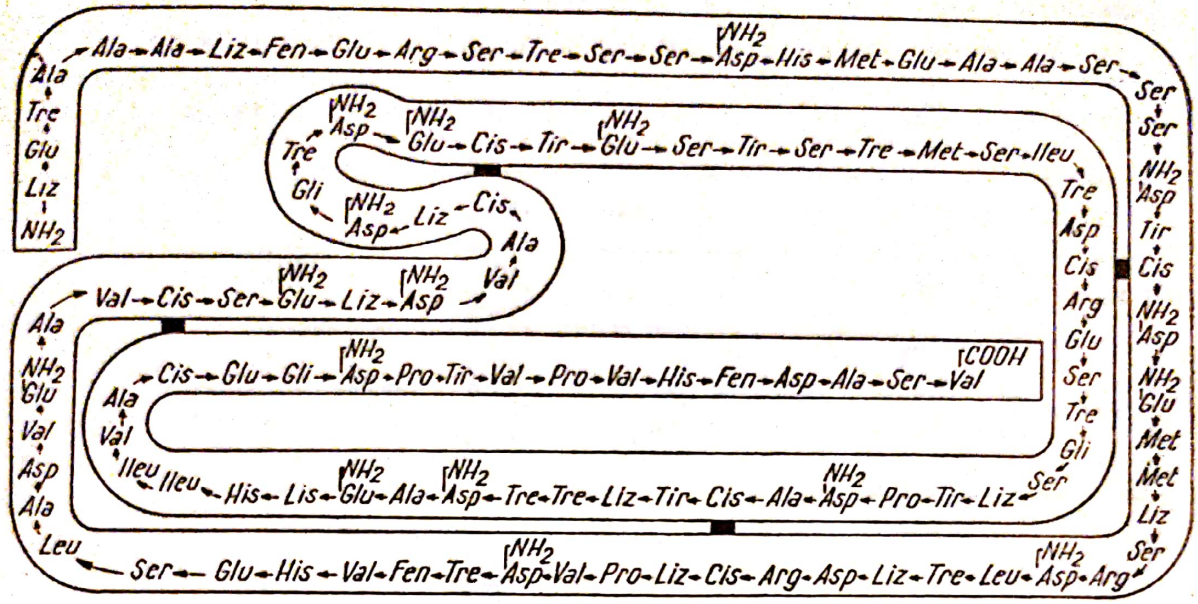


Fig. 3.5. Structura primară a ribonucleazei.

Trebuie subliniat faptul că în desenele din fig. 3.3. pînă la 3.5. punctele de contact dintre lanţuri sau dintre diferitele porţiuni ale unui lanţ sînt indicate corect, dar că felul de încolăcire a lanţurilor a fost reprezentat într-un mod cu totul arbitrar, pentru a permite punerea în pagină a desenului (după Spackman, Stein şi Moore, 1960).

nici un fel de regularitate în secvenţa aminoacizilor, tot aşa cum, spre exemplu, în limba engleză scrisă nu este obligatoriu ca litera q să fie totdeauna urmată de u. (Mătasea, colagenul şi protaminele constituie, din acest punct de vedere, excepţii — vezi cap. 4 şi 9. În cap. 11 sînt prezentate pe scurt procedeele utilizate pentru determinarea secvenţelor reproduse în fig. 3.3—3.6).

Aminoacidul cisteină (tabelul 3.1) joacă un rol întrucîtva aparte. Catenele laterale ale cisteinei pot fi legate între ele în urma unor reacţii de oxidare:

$$\underset{\text{cisteină}}{-CH_2-SH} + \underset{\text{cisteină}}{HS-CH_2-} + O \rightleftharpoons \underset{\text{cistină}}{-CH_2-S-S-CH_2-} + H_2O$$

În lanţurile polipeptidice ale ocitocinei, vazopresinei, insulinei şi ribonucleazei aceste legături duc la formarea de bucle, iar în cazul insulinei determină şi legarea între ele a celor două lanţuri care o alcătuiesc. Numărul de legături S-S din diferitele proteine este reprezentat, în tabelul 3.2, prin cifrele trecute în coloana cistinei (cistina fiind aminoacidul rezultat din unirea a două molecule cisteină printr-o legătură S-S).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 3.1

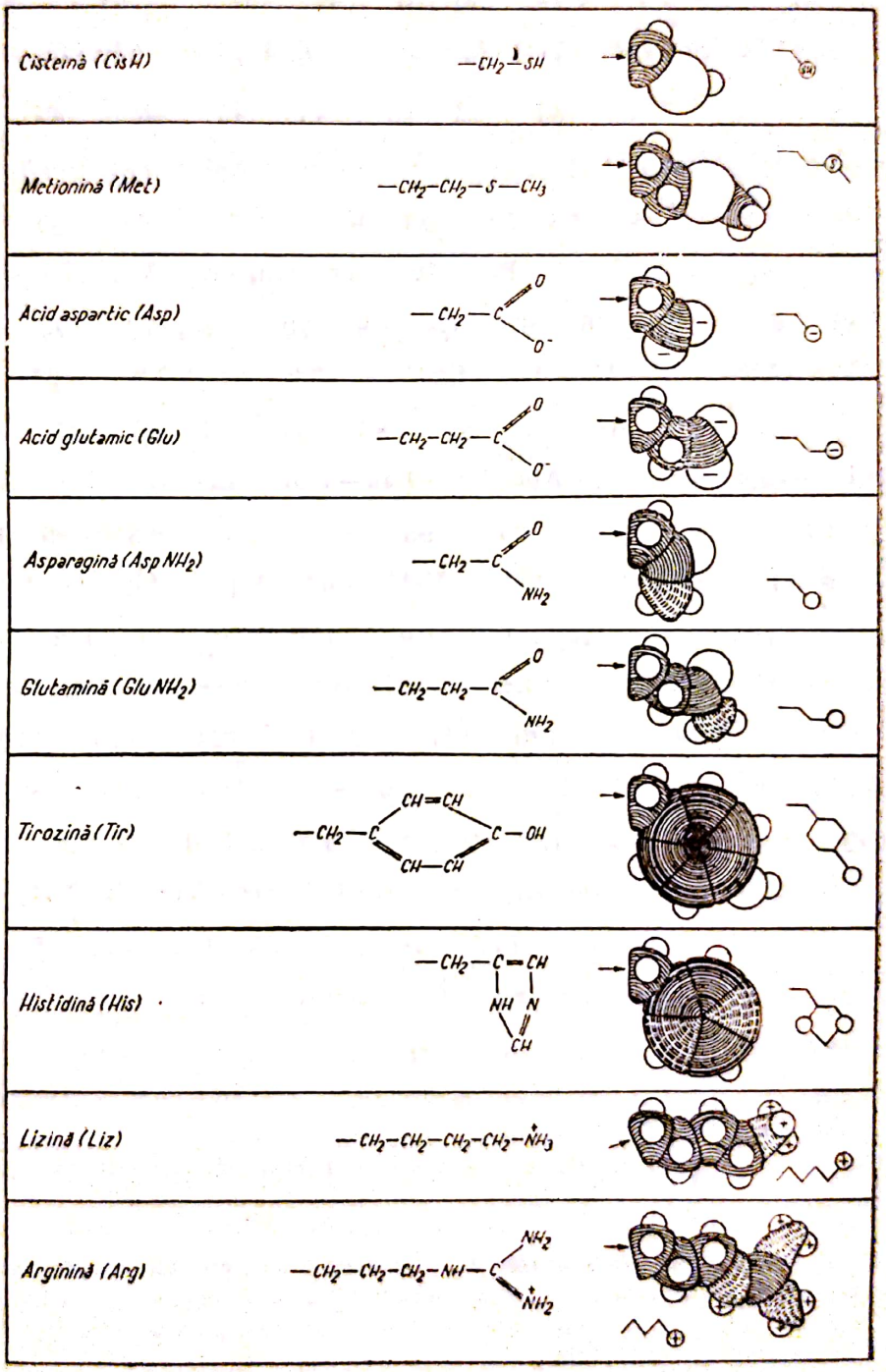
Catenele laterale (grupările R) ale celor 20 de aminoacizi principali

Tabelul cuprinde formulele chimice, desenele modelelor moleculare, precum și simbolurile „stenografice" ce vor fi folosite în figurile ulterioare.

Glicină (Gli)	—H	
Alanină (Ala)	—CH_3	
Valină (Val)	—CH(CH_3)(CH_3)	
Leucină (Leu)	—CH_2—CH(CH_3)(CH_3)	
Izoleucină (Ileu)	—CH(CH_2—CH_3)(CH_3)	
Fenilalanină (Fen)	—CH_2—C_6H_5	
Prolină (Pro)		
Triptofan (Tri)	—CH_2—C_8H_6N	
Serină (Ser)	—CH_2—OH	
Treonină (Tre)	—CH(OH)(CH_3)	

Scanned with OKEN Scanner

Săgeţile indică orificiile existente în aceste modele, care se adaptează pe „ţăruşii" modelului din fig. 3.1. Catena laterală a prolinei formează o buclă, capătul catenei fiind legat printr-o legătură covalentă cu azotul din structura axială. De aceea, în acest caz, atît desenul, cît şi formula reprezintă întregul rest de aminoacid, şi nu numai catena laterală.



Scanned with OKEN Scanner

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Acetil—Ser—Tir—Ser—Ileu—Tre—Pro—Tre—Ser—$GluNH_2$—Fen—Val—Fen—

13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

—Leu—Ser—Ser—Ala—Tri—Ala—Asp—Pro—Ileu—Glu—Leu—Ileu—Asp*—

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

—($CiSO_3H$,Tre,Asp*)—Leu—Ala—Leu—Gli—$AspNH_2$—$GluNH_2$—Fen—Glu*—Tre—

38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49

—Glu—$GluNH_2$—Ala—Arg—Tre—Val—Glu*—Val—Arg—$GluNH_2$—Fen—Ser—

50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62

—$GluNH_2$—Val—Tri—Liz—Pro—Pro—Ser—$GluNH_2$—Val—Tre—Val—Arg—Fen—

63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76

—Pro—Asp*—Ser—Asp—Fen—Liz—Val—Tir—Arg—Tir—Asp*—Ala—Val—Asp—

77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90

—Pro—Leu—Val—Tre—Ala—Leu—Leu—Leu—Gli—Ala—Fen—Asp*—Tre—Arg—

91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102

—$AspNH_2$—Arg—Ileu—Glu*—Val—Glu*—Asp*—(Ala—Glu*,Tre, Asp*, Pro)—

103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115

—Tre—Ala—Glu*—Tre—Leu—Asp*—Ala—Tre—Arg—Arg—Val—Asp*—Asp*—

116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128

—Ala—Tre—Val—Ala—Ileu—Arg—Ser—Ala—Asp*—Ileu—$AspNH_2$—Leu—Ileu—

129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142

—Val—Glu—Leu—Ileu—Arg—Gli—Tre—Gli—Ser—Tir—$AspNH_2$—Arg—Ser—Ser—

143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156

—Fen—Glu*—Ser—Ser—Ser—Gli—Leu—Val—Tri—Tre—Ser—Gli—Pro—Ala—

157

—Tre—COOH

Fig. 3.6. Structura primară a proteinei tipului sălbatic de virus al mozaicului tutunului (VMT).

Parantezele indică porțiuni în care secvența aminoacizilor este încă incertă. Asp* = Asp sau $AspNH_2$, Glu* = Glu sau $GluNH_2$. Uneori (dar nu întotdeauna) între diferitele tulpini de VMT există deosebiri ale compoziției în aminoacizi și deci un oarecare grad de variație și în structura primară Anderer și colab., 1960).

Acum, după ce am prezentat în termeni preciși secvențele specifice ale cîtorva proteine, trebuie să analizăm mai critic afirmația întrucîtva îndrăzneață făcută la începutul discutării acestei probleme. Trebuie să lămurim dacă este sau nu adevărat că moleculele unui preparat proteic cu un grad de puritate suficient de avansat prezintă într-adevăr toate aceeași secvență de aminoacizi. Înainte de anul 1950, cînd încă nu fuseseră determinate secvențele reproduse în fig. 3.4—3.6, răspunsul la această întrebare era în mare măsură de natură speculativă. O dată cu perfecționarea tehnicilor de purificare a proteinelor, în prima jumătate a secolului nostru, o serie de preparate despre care înainte se credea că sînt omogene au putut fi fracționate în mai multe componente (de exemplu, proteinele serice discutate în cap. 2). Părea astfel posibil ca, extinzînd aceste observații, să se poată evidenția pînă și la nivelul moleculelor individuale un oarecare grad de eterogenitate, moleculele unui anumit preparat purificat dovedindu-se identice din punctul de vedere al proprietăților lor fizice, chimice și chiar biologice, dar prezentînd totuși unele variații individuale de compoziție sau secvență a aminoacizilor.

Astăzi, punctul de vedere menționat mai sus nu mai poate fi susținut în cazul acestor proteine (fig. 3.4—3.6), ale căror secvențe au fost determinate cu precizie. Procedeul de determinare a secvenței elaborat de Sanger la Cambridge (cap. 11) implică ruperea lanțurilor în fragmente, stabilirea secvenței în aceste fragmente și apoi reconstituirea secvenței originale. Dacă între secvențele moleculelor originale din preparatul respectiv ar exista variații cît de cît semnificative, nu s-ar putea reconstitui, din fragmentele acestora, un singur tip de secvență.

Cercetările lui Sanger asupra insulinei au stabilit un criteriu nou și suficient de satisfăcător pentru aprecierea gradului de puritate al unui preparat de proteină, și anume că toate moleculele din preparatul respectiv trebuie să aibă aceeași structură primară. Faptul că metodele sale au putut fi extinse la studiul secvenței de aminoacizi din moleculele de ribonuclează, proteină a VMT, mioglobină, hemoglobină și alte proteine arată că insulina nu este o proteină particulară din acest punct de vedere. Din aceste cercetări rezultă cu multă probabilitate că întotdeauna proteinele se formează în celulă cu o secvență specifică și nu printr-o asamblare la întîmplare sau nespecifică a amino-

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 3.2

Compoziția în aminoacizi a proteinelor (1) (exprimată

	Greutate moleculară	Alanină	Glicină	Valină	Leucină	Izoleucină	Prolină	Fenilalanină	Tirozină	Triptofan	Serină	Treonină
Insulină de om (3)	6 000	1	4	4	6	2	1	3	4	0	3	3
Ribonuclează	15 000	12	3	9	2	3	4	3	6	0	15	10
Lizozim	15 000	10	11	6	8	6	2	3	3	8	9	7
β—lactoglobulină	37 000	30	7	18	44	17	17	9	8	3	14	16
Ovalbumină	45 000	35	19	28	32	25	14	21	9	3	36	16
Mioglobină de cal	17 000	15	13	6	22	0	5	5	2	2	6	7
Hemoglobină de cal	68 000	54	48	50	75	0	22	30	11	5	35	24
Serumalbumină de om	69 000	—	15	45	58	9	31	33	18	1	22	27
Fibrinogen de om (6)	160 000	66	120	56	86	59	78	45	48	26	107	83
γ—globulină de om (7)	160 000	—	90	133	114	34	112	45	61	22	175	114
Salmină	8 000	1	3	2	0	1	4	0	0	0	7	0
Histona din timus de viţel	15 000	12	9	4	6	24	5	4	3	0	7	6
Pepsină	34 000	—	29	21	27	28	15	13	16	4	40	28
Chimotripsinogen	24 000	16	20	21	16	9	8	5	3	7	25	22
Proteina VMT(4)	17 000	14	6	14	12	8	8	8	4	3	16	16
Proteina VMGN(4)	— (2)	61	51	53	66	56	103	22	12	—	64	103
Proteina de ribozom de iepure (4)	— (2)	61	95	61	66	43	41	27	36	6	—	38

Scanned with OKEN Scanner

prin numărul de resturi de aminoacizi/moleculă)

Cistină	Cisteină	Metionină	Arginină	Histidină	Lizină	Ac. aspartic + asparagină	Ac. glutamic + glutamină	Hidroxiprolină	Hidroxilizină	Amide (asparagină + glutamină)	% catene laterale hidrocarbonice	+ la pH 7 (arg. + liz. + ½ his.)	− la pH 7 (asp. + glu.)	
3	0	0	1	2	1	3	7	0	0	6	41	3	4	Insulină de om
4	0	4	4	4	10	15	12	0	0	17	29	16	10	Ribonuclează
5	—	2	11	1	6	20	4	0	0	28	44	37	52	Lizozim
3	3	8	6	4	29	32	48	0	0	28	44	37	52	β—lactoglobulină
1	5	16	15	7	20	32	52	0	0	33	45	39	51	Ovalbumină
0	0	2	2	9	18	10	19	0	0	8	44	25	21	Mioglobină de cal
0	4	4	14	36	38	51	38	0	0	36	47	70	53	Hemoglobină de cal
16	4	6	25	16	58	46	80	0	0	44	—	91	82	Serumalbumină de om
14	5	27	72	27	101	157	158	0	0	170	58	187	146	Fibrinogen de om
16	10	11	45	26	88	106	128	0	0	127	—	146	107	γ—globulină de om
0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	19	40	0	Salmină
0	0	0	15	2	11	7	5	0	0	10	49	27	2	Histona din timus de vițel
2	2	4	2	2	2	41	28	0	0	32	—	5	37	Pepsină
3	3	2	4	2	13	20	12	0	0	27	44	18	5	Chimotripsinogen
0	1	0	11	0	2	18	16	0	0	—	47	13	—	Proteina VMT
—	0	14	13	10	34	48	52	0	0	—	46	52	—	Proteina VMGN
—	9	13	68	18	87	66	78	0	0	—	44	164	—	Proteina de ribozom de iepure

Scanned with OKEN Scanner

Continuarea tabelului 3.2

	Greutate moleculară		Alanină	Glicină	Valină	Leucină	Izoleucină	Prolină	Fenilalanină	Tirozină	Triptofan	Serină	Treonină
α-Cazeină	—	(2)	43	30	54	60	49	65	28	45	8	60	41
Miozină de iepure (5)	—	(2)	78	39	42	79	42	22	27	18	4	41	41
Actină de iepure (5)	—	(2)	71	67	42	63	57	44	29	32	10	56	59
Tropomiozină de iepure (5)	—	(2)	101	12	38	95	29	0	3	15	0	40	28
Fibroina de mătase	—	(2)	334	581	31	7	8	6	20	71	0	154	13
Colagen	—	(2)	107	363	29	28	15	131	15	5	0	32	19
Elastină	—	(2)	58	376	118	56	23	136	29	8	—	9	10
Cheratina din lînă	—	(2)	46	87	40	86	—	8[illegible]	22	26	9	95	54

În cele trei coloane din dreapta tabelului este redat procentul de catene laterale pur hidrocarbonice din proteina respectivă, numărul de grupări care la pH 7 poartă o sarcină pozitivă și numărul celor care la același pH poartă o sarcină negativă. Numărul de grupări pozitive a fost obținut adunînd numărul de resturi de arginină cu numărul de resturi de lizină + jumătate din numărul resturilor de histidină (întrucît gruparea histidinică are un pK ~ 7 și la pH ~ 7, aproximativ jumătate din aceste resturi se vor găsi în stare ionizată. Numărul de grupări negative a fost obținut adunînd numărul resturilor de acid aspartic și asparagină cu numărul resturilor de acid glutamic și glutamină, minus numărul grupărilor amidice. Conținutul în cistină este o măsură a numărului de legături S—S din moleculă.

Cistină	Cisteină	Metionină	Arginină	Histidină	Lizină	Ac. aspartic + asparagină	Ac. glutamic + glutamină	Hidroxiprolină	Hidroxilizină	Amide (asparagină + glutamină)	% catene laterale hidrocarbonice	+ la pH 7 (arg. + liz. +½his.)	− la pH 7 (asp. + glu.)	
2	—	17	25	19	61	63	153	0	0	114	37	95	102	α—cazeină
4	—	22	41	15	85	85	155	0	0	86	37	134	154	Miozină de iepure
5	—	30	38	19	52	82	101	0	0	66	41	99	117	Actină de iepure
3	—	16	42	5	110	89	211	0	0	64	32	155	236	Tropomiozina de iepure
—	—	—	6	2	5	21	15	0	0	—	77	12	—	Fibroina de mătase
0	0	5	49	5	31	47	77	107	7	47	72	83	77	Colagen
2	—	0	6	0	3	4	22	0	0	—	92	9	—	Elastina
49	—	5	60	7	19	54	96	0	0	83	—	83	67	Cheratina din lînă

[1] După Tristram, G. R., în *The Proteins*, sub red. H. Neurath şi K. Bailey, vol. 1 A, Academic Press, New York, 1953, cu excepţia cazurilor în care sînt date alte indicaţii bibliografice.

[2] În cazurile în care nu se cunoaşte greutatea moleculară precisă a unei proteine, cifrele reprezintă resturi de aminoacizi raportate la o greutate moleculară de 100 000, adică moli/10^5 g de proteină.

[3] Sanger, F., „Brit. med. Bull.", *16*, 183, 1960.

[4] T S'O, P. O. P., Bonner, J. şi Dintzis, H., „Arch. Biochem. Biophys.", *76*, 225, 1958.

[5] Kominz, D. R., Hough, A., Symonds, P. şi Laki, K., „Arch. Biochem. Biophys.", *50*, 148, 1954.

[6] Laki, K., Gladner, J. A. şi Folk, J. E., „*Nature*", Lond., *187*, 758, 1960.

[7] Phelps, R. A. şi Putnam, F. W., în *The Plasma Proteins*, sub red. F.W. Putnam, vol. 1, New York, Academic Press, 1960.

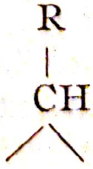
Scanned with OKEN Scanner

acizilor. Dacă acest lucru este adevărat, rezultă că această nouă definiţie a purităţii proteinelor are o aplicabilitate generală şi că afirmaţia noastră iniţială — că toate moleculele unui preparat purificat prezintă aceeaşi secvenţă — este tocmai definiţia a ceea ce se consideră astăzi a fi un preparat de proteină pur. (Pentru moleculele mici, cristalizarea constituie un criteriu de puritate satisfăcător, dat fiind că în structura cristalului nu pot fi încorporate decît molecule identice: în cazul proteinelor însă, acest criteriu este nesatisfăcător.)

Insulinele diferitelor specii nu pot fi deosebite între ele prin activitatea lor hormonală, deşi s-au pus în evidenţă mici deosebiri ale compoziţiei lor în aminoacizi, iar Sanger a arătat (fig. 3.4) că secvenţele lor diferă prin unul sau două resturi de aminoacizi. Diferenţierile se întîlnesc mai ales într-o porţiune localizată a structurii primare. Vom vedea în cap. 11 că asemenea variaţii de secvenţă localizate se întîlnesc şi în anumite molecule de hemoglobine normale şi anormale. Aceste deosebiri între proteine similare ridică probleme pasionante de genetică şi evoluţie chimică, asupra cărora vom reveni în capitolele următoare. În cap. 12, în special, vom discuta sinteza proteinelor şi modul în care are loc asamblarea aminoacizilor în secvenţe specifice, sub control genetic.

Va trebui să analizăm acum modul în care forma moleculelor proteice şi specificitatea interacţiunilor lor sînt determinate de detaliile secvenţei aminoacizilor şi de natura grupărilor de aminoacizi din catenele laterale. Vom vedea că lanţurile polipeptidice se răsucesc, se încolăcesc pe ele însele, formînd structuri moleculare tridimensionale şi că în descrierea unei molecule de proteină determinarea secvenţei, a structurii primare, nu reprezintă decît începutul.

STRUCTURA SECUNDARĂ

Structura axială reprezentată în fig. 3.1 nu este rigidă. În timp ce legăturile *duble* solidarizează între ei atomii în mod rigid, legăturile *simple* permit rotaţia în jurul axei legăturii respective. (Ambele tipuri nu permit decît foarte mici abateri în ceea ce priveşte lungimea şi unghiul de legare.) Legăturile simple aflate de fiecare parte a grupării peptidice  formează

între ele un unghi de aproximativ 110° (fig. 3.1), iar rotația în jurul unor legături ce formează un unghi între ele face ca lanțul respectiv să fie în întregime flexibil. În fig. 3.7 se încearcă ilustrarea celor de mai sus prin reprezentarea unor baghete îndoite,

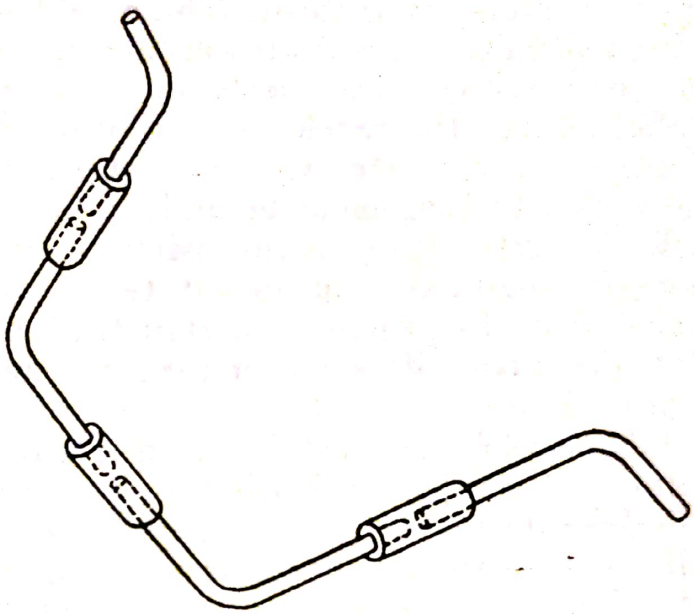


Fig. 3.7. Desen arătînd cum o rotație în jurul unor legături dispuse în unghi una față de cealaltă dă naștere unui model molecular flexibil.

Trebuie presupus că bachetele îndoite din acest desen se pot roti liber în scurtele manșoane tubulare prin care sînt reunite.

unite între ele prin manșoane în interiorul cărora trebuie să ne închipuim că baghetele se pot roti liber.

La temperatura camerei sau la temperatura corpului (37 °C), moleculele se găsesc, bineînțeles, într-o mișcare continuă și rapidă ; ca atare, ne vom aștepta ca un lanț polipeptidic aflat într-o soluție să-și schimbe continuu și la întîmplare configurația, ca un fir de ață într-o apă agitată. Este ceea ce se observă în realitate în cazul peptidelor cu greutate moleculară relativ mică și, în anumite condiții, și la unele peptide sintetice cu greutate moleculară relativ mare. La aceste molecule, atît vitezele de difuziune (vitezele cu care se deplasează moleculele în masa unei soluții sub acțiunea mișcării termice nedirijate), cît și vitezele de sedimentare (vitezele cu care se depun moleculele într-un cîmp centrifugal cu accelerație mare) au valori apropiate de cele anticipate în mod teoretic pentru moleculele încolăcite la întîmplare, cu o formă în continuă schimbare. Nu același lucru se constată însă în cazul proteinelor globulare. Vitezele de difuziune, vitezele de sedimentare și numeroase alte caracteristici pledează în favoarea încolăcirii într-un fel anumit a lanțurilor

Scanned with OKEN Scanner

peptidice din aceste proteine, avînd ca urmare formarea unei molecule relativ compacte.

Cunoştinţele noastre asupra felului în care sînt încolăcite lanţurile din moleculele de proteine, ca şi, de altfel, asupra multora dintre detaliile de structură a moleculelor mai mici au fost obţinute cu ajutorul tehnicii difracţiei cu raze X. Cristalele sînt alcătuite din unităţi atomice sau moleculare care se repetă cu regularitate, iar electronii din componenţa lor difractă, adică împrăştie razele X sub diferite unghiuri ce depind de intervalele interatomice sau intermoleculare din cristal. Dacă se cunoaşte lungimea de undă a razelor X, măsurarea unghiurilor de difracţie şi a intensităţilor poate servi la determinarea poziţiei regiunilor cu densitate electronică mai mare din cristal şi deci, în principiu, a structurii tridimensionale a moleculelor. (Tehnica difracţiei cu raze X este discutată mai pe larg în anexa 1.)

Moleculele de proteine conţin mii de atomi iar cristalele de proteine dau spectre de difracţie pe care se observă sute de puncte produse de razele X ce au fost împrăştiate sub diferite unghiuri (fig. 3.16). În această situaţie complexă, sînt posibile două căi de abordare a problemei: prima constă în analizarea spectrelor complexe de difracţie cu ajutorul maşinilor de calcul, a doua — în construirea unor modele moleculare de lanţuri peptidice, anticipînd diversele feluri în care ar putea fi îndoite şi încolăcite şi apoi confruntînd structura propusă cu spectrele de difracţie. (Din motive de ordin tehnic, discutate în anexa 1, este mult mai uşor să se identifice tipul de difracţie pe care îl va provoca o anumită structură dată decît să se determine cum arată structura care a produs un anumit spectru de difracţie.) În ultimii 40 de ani, ambele metode de studiu menţionate s-au dezvoltat paralel.

Prin anul 1933 devenise clar faptul că una din trăsăturile principale ale spectrelor de difracţie cu raze X date de multe proteine — predominanţa unui arc de difracţie corespunzînd, în diferitele proteine, unor distanţe interatomice de 5 pînă la 5,5 Å — nu ar fi putut fi produsă de lanţuri peptidice neîncolăcite, întinse ca în fig 3.1. Aşa cum a remarcat pentru prima dată Astbury, aceasta înseamnă că lanţurile peptidice din moleculele de proteină sînt de obicei îndoite după o schemă regulată. S-au propus diferite tipuri de încolăcire, bazate pe modurile în care

Scanned with OKEN Scanner

puteau fi îndoite diversele modele moleculare, dar nici unul dintre cele propuse înainte de anul 1951 nu corespundea cu toate datele furnizate de difracţia cu raze X, de spectroscopie şi de alte metode.

Încă din 1937, Pauling şi Corey şi-au dat seama că soluţionarea cu succes a acestei probleme depinde de fidelitatea cu care modelele construite reproduc comportarea reală a lanţurilor polipeptidice. Modelele incorecte vor permite tot felul de îndoiri cu totul diferite faţă de cele suferite de lanţurile peptidice din proteine. În schimb, un model cu adevărat bun nu va permite decît exact acel tip sau tipuri de încolăcire care se întîlnesc la polipeptide, ducînd astfel imediat la soluţia adevărată. Ei au întreprins de aceea un studiu amănunţit al spectrelor de difracţie cu raze X date de cristalele de aminoacizi şi peptide mici şi, pe baza datelor astfel obţinute, au construit modele corecte de tipul celui reprodus în desenul din fig. 3.1. Lungimile şi unghiurile legăturilor, precum şi raza fiecărui atom din model au fost raportate la scară la lungimile şi unghiurile legăturilor şi la volumul ocupat de atomii respectivi din cristalele de aminoacizi şi peptide. Modelele lor permiteau rotaţia liberă în jurul legăturilor simple, precum şi un grad redus de flexibilitate la nivelul fiecărei legături, dedus prin determinarea distorsiunilor moleculare discrete observate în cristale.

În 1951, Pauling şi Corey au publicat o serie de articole care reprezentau roadele acestor studii*. Ei au emis supoziţia că modalitatea cea mai probabilă de îndoire sau răsucire a unui lanţ peptidic ar fi cea elicoidală, sub forma unei spirale lungi, aşa cum este redată în porţiunea inferioară a fig. 3.8. În această figură este reprezentat modelul structurii axiale a unui lanţ polipeptidic încolăcit la întîmplare, care, la capătul său inferior, este răsucit în formă de spirală. Pauling şi Corey discută în articolele lor o serie de spirale şi tipuri de încolăcire care, conform modelelor realizate de ei, ar putea fi întîlnite la proteine. Structura reprodusă în porţiunea inferioară a fig. 3.8 a fost denumită de ei α-helix. În α-helix există aproximativ 3 2/3 resturi de

---

* Indicaţiile bibliografice (articole, referate generale şi cărţi) pentru o documentare mai aprofundată se găsesc grupate, pe capitole şi paragrafe, în bibliografia de la sfîrşitul acestui volum. Articolele menţionate în lista indicaţiilor bibliografice ale figurilor, inserată după bibliografie, constituie şi ele o sursă suplimentară de documentare.

Scanned with OKEN Scanner

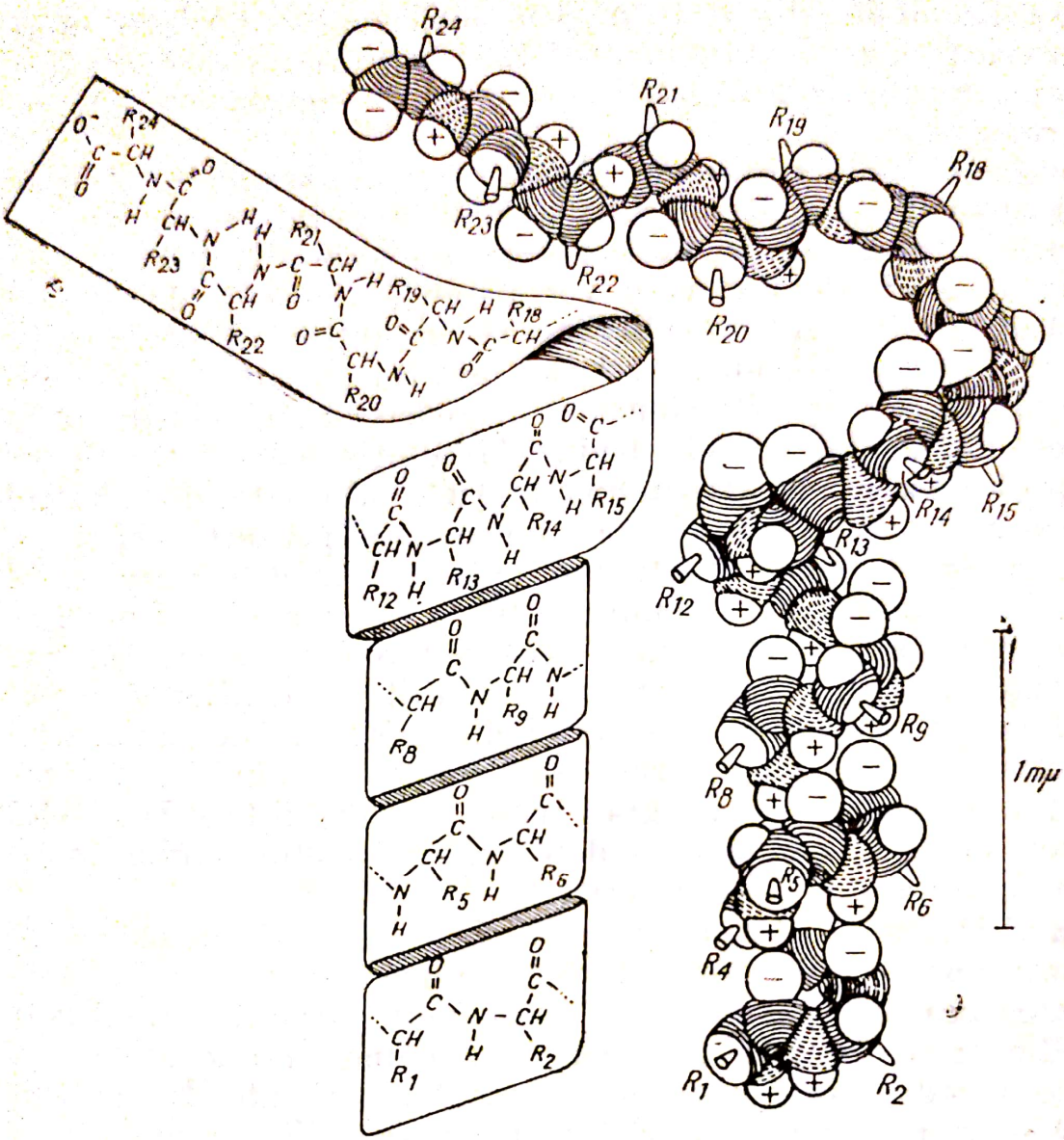


Fig. 3.8. Desenul unui model molecular al structurii axiale a unui lanţ peptidic înfăşurat într-un α-helix cu răsucire spre dreapta.

După cum se vede din panglica desenată alături de modelul molecular, porţiunea inferioară a lanţului formează două spire ale unui α—helix. În partea de sus, lanţul este încolăcit la întîmplare, fiind complet desfăşurat (ca în fig. 3.1) la extremitatea sa superioară.

aminoacizi pentru fiecare spiră sau 11 resturi în 3 spire ale helixului. Fig. 3.9 arată aspetul unei spire a α-helixului privit în lungul axului său, de această dată fiind reprezentate şi catenele laterale legate de scheletul peptidic.

În fig. 3.8 şi 3.1 atomii de hidrogen legaţi de azot aflaţi de-a lungul structurii axiale au fost înfăţişaţi ca regiuni cu încăr-

Scanned with OKEN Scanner

cătură negativă. (În anexa 2 se discută modul în care se realizează această distribuire a sarcinilor.) În α-helix (porțiunea inferioară a fig. 3.8), fiecare hidrogen cu sarcină pozitivă din structura axială a peptidului este atras de oxigenul încărcat negativ din spira următoare a helixului. Grupările N—H și =O aliniate în acest fel sînt considerate ca formînd între ele ceea ce

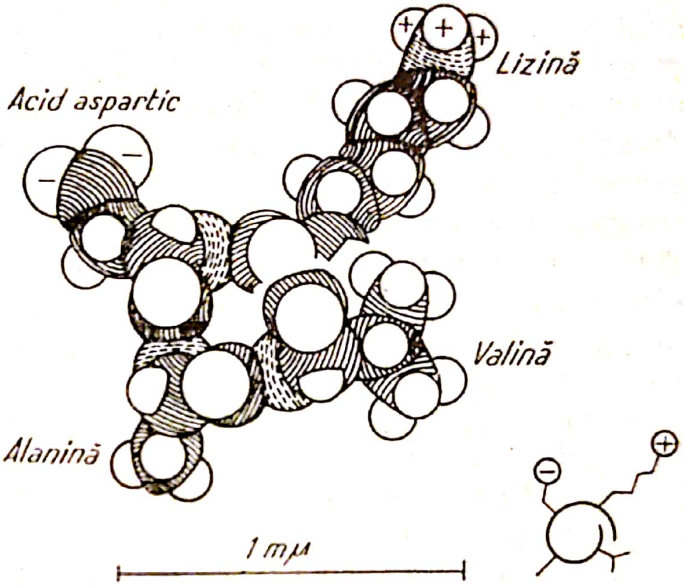


Fig. 3.9. Aspectul unei spire din α-helix, privită în lungul axului.

În acest model, pe structura axială au fost fixate catene laterale ales în mod arbitrar. În reprezentarea schematică din dreapta jos, catenele laterale sînt figurate prin simbolurile „stenografice" din tabelul 3.1. Această reprezentare schematică redusă a α-helixului este cea pe care o vom folosi și în figurile următoare.

se numește legături de hidrogen (discutate mai amănunțit în anexa 2).

După cum reiese din fig. 3.8, legăturile de hidrogen sînt în mod predominant de natură electrostatică. Pauling și Corey au descoperit că ele au o mare importanță în determinarea detaliilor de dispunere a moleculelor din cristalele de aminoacizi și peptide mici. Ei au urmărit cu scrupulozitate ca dimensiunile și unghiurile acestor legături în modelele lor să fie, ca și în cazul legăturilor covalente, în strînsă analogie cu dimensiunile și unghiurile legăturilor corespunzătoare din cristalele de aminoacizi și peptide. Legăturile de hidrogen dintre grupările O—H și N—H se pot forma în moduri diferite (vezi tabelul din anexa 2) și ele joacă un rol important în determinarea structurii atît a acizilor nucleici, cît și a proteinelor (cap. 9).

Se putea prevedea că în spectrul de difracție cu raze X produs de lanțurile peptidice în formă de α-helix se vor putea găsi nu numai indicații asupra existenței unor aranjamente moleculare repetate la intervale de 5 pînă la 5,5 Å, corespunzătoare

Scanned with OKEN Scanner

turelor succesive ale spiralei, ci și indicații asupra repetării unor aranjamente la fiecare 1,5 Å, care este distanța dintre resturile succesive de aminoacizi, măsurată de-a lungul axei helixului. După ce Pauling și Corey au publicat rezultatele experiențelor lor pe modele construite, s-a căutat punerea în evidență, în spectrele de difracție cu raze X, a unor date care să arate repetarea unor elemente structurale la intervale de 1,5 Å ; indicații asupra existenței unor asemenea intervale au fost într-adevăr găsite și nu numai în spectrele nou obținute, ci și în rezultatele unor cercetări mai vechi de difracție cu raze X. Anterior, aceste indicații fuseseră trecute cu vederea, deoarece nu li se cunoștea semnificația. α-helixul mai poate fi cercetat și pe altă cale, prin compararea cu spectre de difracție cu raze X ; există dovezi obținute prin această tehnică în sensul că cel puțin o parte din structura moleculară a miozinei, hemoglobinei, mioglobinei, cheratinei din păr și din pene și a peptidelor sintetice, în solvenți adecvați, prezintă acest tip de înfășurare.

Din tabelul 3.1 se poate vedea că toți aminoacizii, cu excepția glicinei, conțin un atom de carbon asimetric și pot deci exista în două forme ce sînt una imaginea în oglindă a celeilalte (L — și D—). În proteine nu se găsesc decît L-aminoacizi, iar lanțul reprezentat în fig. 3.1 este un lanț de L-aminoacizi. În helix, catena de aminoacizi poate fi înfășurată fie spre dreapta, fie spre stînga, dar se pare că, în cazul unui lanț de L-aminoacizi se formează mai degrabă un helix cu înfășurare spre dreapta decît spre stînga. Explicația acestui fenomen poate fi dedusă pînă la un punct din modelele moleculare, dat fiind că într-o spirală de L-aminoacizi răsucită spre stînga primul atom de carbon din catenele laterale va ajunge prea aproape de atomii de oxigen din structura axială ; pe de altă parte, studierea mioglobinei prin difracția cu raze X a ajuns astăzi la un asemenea grad de finețe, încît permite să se observe că regiunile în α-helix ale moleculei sînt înfășurate spre dreapta. Spiralele cu înfășurare spre dreapta sau spre stînga mai pot fi deosebite și prin efectul lor asupra rotației optice. Studii de rotație optică, efectuate cu diverse proteine, au arătat că nu există decît spirale cu răsucire spre dreapta sau că, în orice caz, în proteine forma cu înfășurare spre dreapta predomină net asupra celei în sens invers.

Structura în α-helix nu este singurul tip de încolăcire sau înfășurare care poate fi adoptat de lanțurile polipeptidice. Vom

Scanned with OKEN Scanner

vedea, în cap. 4, că secvenţele din catenele laterale ale mătăsii şi colagenului duc la un tip diferit de încolăcire; deşi pînă în prezent nu există nici o dovadă a existenţei vreunui alt tip de încolăcire sau înfăşurare a proteinelor globulare în afara celei în α-helix, este posibil ca, în momentul în care va fi studiată în mod amănunţit o diversitate mai mare de proteine, să se găsească şi alte tipuri de încolăcire sau spiralări. Acest tip de încolăcire sau desfăşurare strînsă adoptat de lanţurile peptidice ale unei proteine (de exemplu α-helixul) a primit denumirea de structură *secundară* a proteinei.

GRADUL ÎNCOLĂCIRII SAU ÎNFĂŞURĂRII SECUNDARE

Am arătat că există dovezi satisfăcătoare ale existenţei unor lanţuri peptidice sub formă de α-helix în unele proteine şi am discutat cum formarea de legături de hidrogen în interiorul lanţului, între grupările structurii axiale a acestuia, favorizează forma respectivă de încolăcire. Totuşi (după cum vom arăta mai pe larg în anexa 3), se pare că aceste legături de hidrogen intracatenare nu au decît forţa strict necesară pentru a conferi α-helixului o stabilitate limitată într-un mediu apos. Faptul că un lanţ peptidic se încolăceşte sau nu în acest fel depinde mai ales de interacţiunile dintre catenele laterale, de care în discuţia noastră de pînă acum asupra structurii secundare nu ne-am ocupat.

Efectul interacţiunilor dintre catenele laterale asupra formei adoptate de un lanţ peptidic în soluţie apoasă poate fi dedus cu ajutorul studiilor de rotaţie optică întreprinse cu soluţii ale unor peptide sintetice, cum ar fi polilizina (peptid alcătuit numai din resturi de lizină) şi poliacidul glutamic (peptid alcătuit numai din resturi de acid glutamic). În soluţie apoasă, aceste peptide pot exista în oricare dintre cele două forme reprezentate în fig. 3. 8: forma flexibilă, încolăcită la întîmplare şi în continuă schimbare sau α-helixul. Într-o soluţie acidă, în care fiecare rest de lizină este purtătorul unei sarcini pozitive (tabelul 3. 1), polilizina formează un lanţ flexibil, deoarece respingerea dintre catenele laterale împiedică formarea helixului. Într-o soluţie alcalină, în care catenele nu poartă nici o încărcătură electrică, lanţul se înfăşoară în α-helix. Poliacidul glutamic, pe de altă

Scanned with OKEN Scanner

parte, se înfășoară în helix cînd se află într-o soluție acidă — deoarece în acest caz condițiile de aciditate sînt cele în care catenele laterale nu sînt încărcate electric — și se desface în fire flexibile în soluții alcaline, cînd grupările carboxilice sînt

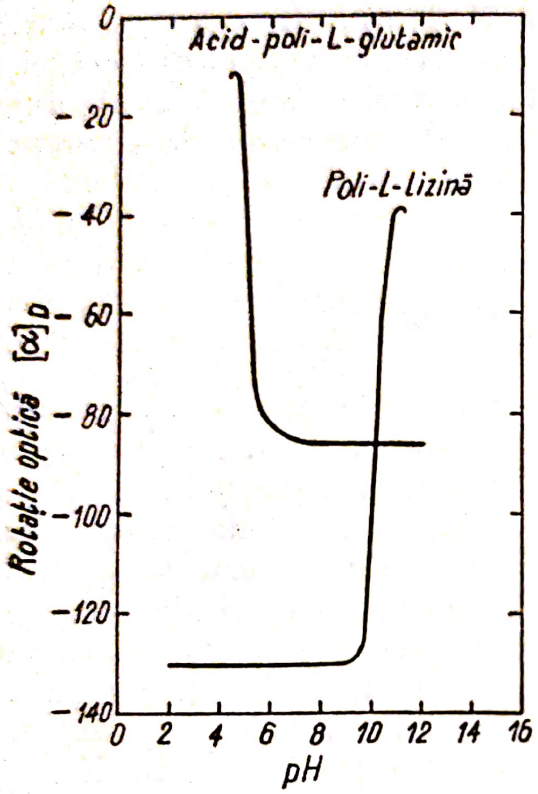


Fig. 3.10. Modificările rotației optice produse de soluții de polilizină și poliacid glutamic în funcție de variațiile de *p*H.

O scădere a rotației optice către valori și mai negative ale coeficienților de rotație ($[\alpha]_D$ corespunde unei desfășurări a α-helixului) (după Doty, 1959).

ionizate. Aceste efecte sînt redate în fig. 3.10, prezența α-helixului reieșind din modificarea apărută în rotația optică provocată de soluție. (Cititorul nefamiliarizat cu noțiunile fizico-chimice ce stau la baza discutării acestor date va găsi în anexa 2 o definiție a *p*H-ului și o succintă descriere a modului în care grupările din catenele laterale ale proteinelor se încarcă electric sau, dimpotrivă, își pierd încărcătura în condiții de aciditate sau alcalinitate.)

Modificarea rotației optice în cursul trecerii unui peptid sintetic de la forma complet încolăcită la o formă complet desfășurată reprezintă un etalon prin care se poate aprecia ce procent din lungimea totală a lanțurilor peptidice dintr-o moleculă de proteină este înfășurat în formă de spirală. Rezultatele obținute din acest punct de vedere cu o serie de proteine diferite sînt redate în tabelul 3.3. Pentru toate aceste proteine, cu excepția

Scanned with OKEN Scanner

ribonucleazei, a cazeinei, actinei și γ-globulinei, rezultatele determinărilor de rotație optică sugerează cu tărie existența unor structuri secundare de tip α-helix. Cu toate acestea, numai o singură proteină, tropomiozina, prezintă un grad de spirale ce se apropie de 100%. În cazul majorității proteinelor, par să se găsească în formă de α-helix numai părți din lanțurile peptidice, această formă fiind probabil favorizată de interacțiunile dintre catenele laterale și de alți factori.

Deși un lanț peptidic constituit din L-aminoacizi pare să formeze mai degrabă un α-helix înfășurat spre dreapta, în anumite porțiuni din structura unor molecule de proteină se poate forma un α-helix înfășurat spre stînga. Dacă se întîmplă acest lucru, aceasta va anula efectul de rotație optică al unei porțiuni cu lungime echivalentă dintr-un helix înfășurat spre dreapta, iar valorile din tabelul 3.3 reprezintă de fapt o măsură

TABELUL 3.3

Tabel cuprinzînd întinderea structurii helicale în diverse proteine aflate în soluție apoasă la *p*H~7

Cifrele pot fi considerate că reprezintă o evaluare a conținutului helical total numai dacă se presupune că nu există zone de α—helix cu răsucire spre stînga. Mai precis, cifrele reprezintă proporția de helixuri cu răsucire spre dreapta în exces față de cele cu răsucire spre stînga.

Tropomiozină	(1)	80—100%
Mioglobină Hemoglobină	(3) (3)	60— 80%
Miozină Insulină	(2) (1)	45— 60%
Ovalbumină Lizozim Fibrinogen	(1) (1) (2)	30— 45%
Pepsină Histonă	(1) (1)	20— 30%
Ribonuclează	(1)	10— 20%
Cazeină Actină γ—globulină	(2) (4) (5)	0— 10%

[1] Doty, P., în *Biophysical Science*, sub red. J. L. Oncley, Wiley, New York, 1960.
[2] Szent—Györgyi, A. G. și Cohen C., „Science", *126*, 697, 1957.
[3] Beychok, S. și Blout, E. R., „J. mol. Biol.", *3*, 769, 1961.
[4] Kay, C. M. „Biochim. biophys. Acta," *43*, 259, 1960.
[5] Winkler, M. și Doty, P., „Biochim., biophys. Acta", *54*, 448, 1961.

a excesului de spirale înfășurate spre dreapta față de cele răsucite spre stînga.

Comportarea peptidelor sintetice discutată mai sus ridică și problema măsurii în care ne putem aștepta la stabilitate din partea structurii tridimesionale a unei molecule de proteină. Există numeroase date care arată că proprietățile moleculelor proteice se modifică o dată cu schimbarea de *p*H și că moleculele suferă o alterare profundă a structurii lor (denaturare ireversibilă) dacă sînt supuse unor condiții de aciditate sau alcalinitate dincolo de anumite limite sau dacă sînt încălzite un timp la temperaturi apropiate de 100 °C. Vom analiza mai întîi alte aspecte ale structurii proteinelor, considerînd moleculele ca pe niște unități statice, după care vom încerca să construim un tablou mai dinamic, mai ales al acelor modificări ale structurii moleculei proteice ce se pot produce în jurul unui *p*H de 7 și al unei temperaturi de 37 °C sau mai mică și care pot juca deci un oarecare rol în activitatea celulară normală. Un exemplu de situație în care se consideră că modificări de acest tip au o importanță biologică sînt efectele *alosterice* care pot juca un rol în controlul sintezei proteinelor (cap. 10).

STRUCTURA TERȚIARĂ

Am discutat una dintre cele două căi, menționate mai înainte, de descifrare a structurii proteinelor: construirea de modele. Recent s-au înregistrat progrese spectaculoase prin folosirea celei de a doua căi de abordare a acestei probleme și anume prin analizarea directă, de către Kendrew, Perutz și colab. a spectrelor complexe de difracție ale proteinelor cristalizate. Proteinele studiate de ei au fost mioglobina și hemoglobina.

Mioglobina este o proteină musculară implicată în transportul și înmagazinarea oxigenului și se găsește în concentrații deosebit de mari în mușchii balenelor și ai focilor. Molecula de mioglobină conține un singur lanț peptidic format din 151 de resturi de aminoacizi și o grupare hemică (fig. 11.1), similară cu cea găsită în hemoglobină și care este locul de legare a oxigenului. Cea mai mare parte din structura primară a mioglobinei a fost determinată (cap. 11).

Scanned with OKEN Scanner

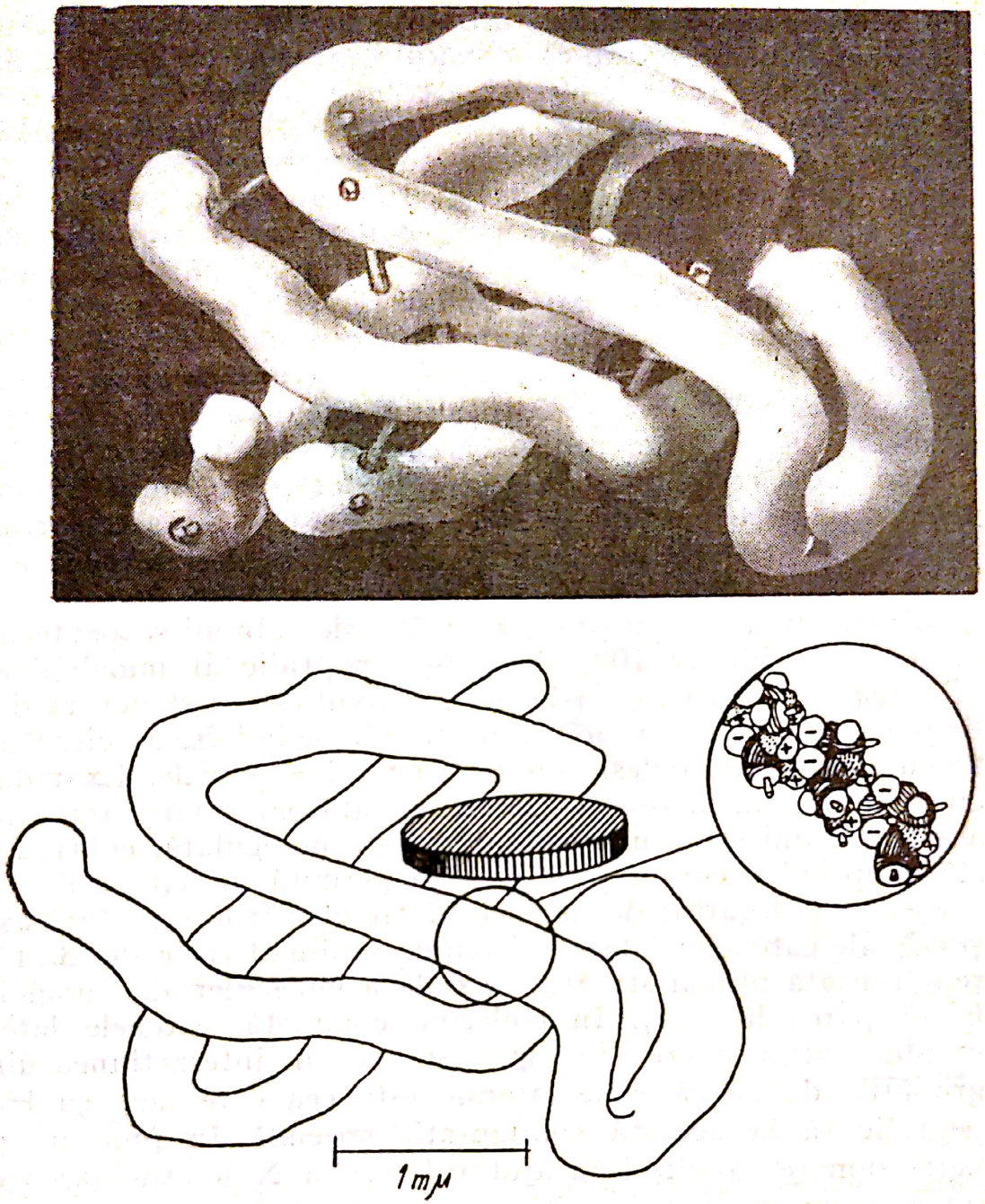


Fig. 3.11. Structura terțiară a mioglobinei.

Fotografia reprezintă un model mai vechi al moleculei, realizat pe baza unui studiu de difracție cu raze X cu putere de separare scăzută (ce nu evidențiază detalii). Tubul încolăcit reprezintă, conform sintezei tridimensionale a lui Fournier (anexa 1), o regiune cu densitate electronică crescută. Regiunea cu densitate electronică mare corespunde structurii axiale a lanțului polipeptidic unic ce alcătuiește molecula. Schița de sub fotografie arată cum, mai tîrziu, cercetări mai amănunțite au clarificat unele incertitudini ce continuau să persiste în legătură cu modul exact de încolăcire a lanțului. Schița arată mai precis orientarea grupării hemice (discul negru din fotografie, haşurat în desen). În porțiunile drepte ale tubului, structura axială este înfășurată în formă de α-helix (a se compara porțiunea reprezentată mărit în medalion cu partea de jos a fig. 3.8) (după Kendrew, 1961).

Scanned with OKEN Scanner

Analizarea spectrelor de difracţie cu raze X date de cristale de mioglobină a arătat că structura ei este cea din fig. 3. 11. Aceasta reprezintă o moleculă de mioglobină. Primul element care trebuie remarcat în această figură este scara dimensiunilor. Metoda de analiză prin difracţie cu raze X, care a dus la deducerea structurii reproduse în fig. 3.11, nu are o putere separatoare suficientă pentru a fi permis detectarea atomilor individuali, ci doar punerea în evidenţă a unui ,,cîrnat'' cu densitate electronică mai mare, care se încolăceşte încoace şi încolo în interiorul moleculei. Ştim din dimensiunile lanţului peptidic (fig. 3.8) că acest ,,cîrnat'' trebuie să fie structura axială încolăcită sau înfăşurată a lanţului peptidic al mioglobinei. Perfecţionarea analizei prin difracţie cu raze X a arătat între timp că porţiunile drepte ale ,,cîrnatului'' reprezintă de fapt regiuni α-helicale. Dacă s-ar creşte puterea de mărire şi cea separatoare, porţiunile drepte ale ,,cîrnatului'' ar arăta ca porţiunea inferioară a lanţului din fig. 3.8 (medalionul din fig. 3. 11).

După lungimea porţiunilor drepte ale tubului se poate aprecia că aproximativ 70% din lanţul peptidic al mioglobinei se află dispus în formă de α-helix. α-helixul este o structură destul de puţin flexibilă, aşa încît în porţiunile de îndoire a ,,cîrnatului'' trebuie să aibă loc o desfacere a structurii α-helicale. Examinarea cu raze X, prin metode cu putere separatoare mare, arată că în aceste regiuni structura secundară este neregulată, coloana axială adoptînd o conformaţie care să permită, pe cît posibil, formarea unor legături de hidrogen între grupările structurii axiale şi cele ale catenelor laterale. Trebuie subliniat că în fig. 3.11 este reprezentată numai structura axială a moleculei de mioglobină (şi gruparea hemică). În molecula completă, catenele laterale umplu spaţiile libere din figură şi tocmai interacţiunea dintre grupările de pe catenele laterale este cea care face ca lanţul peptidic să ia această configuraţie specială. În prezent, prin perfecţionarea analizei cu ajutorul razelor X se studiază aceste interacţiuni, precum şi poziţia exactă a fiecărui atom din molecula de mioglobină (fig. 3.12).

Analizarea cu succes a spectrului de difracţie cu raze X caracteristic moleculei de mioglobină a constituit o piatră de hotar de importanţă fundamentală în studiul structurii proteinelor. Se bănuia, pe baza datelor amintite mai sus, că într-o moleculă de proteină globulară lanţurile peptidice trebuie să fie încolăcite

Scanned with OKEN Scanner

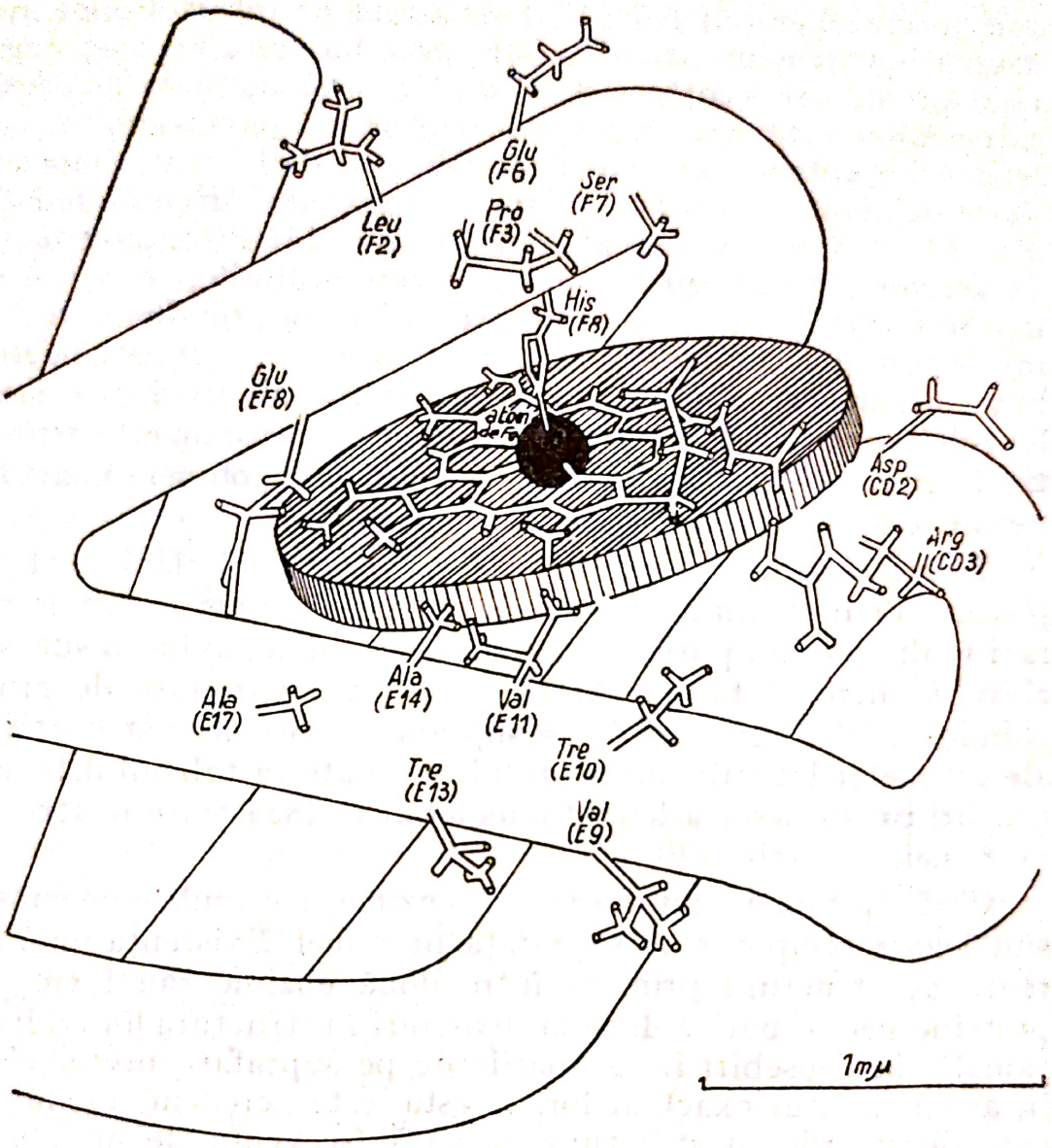


Fig. 3.12. Detaliu al structurii mioglobinei, arătînd poziţia atomilor unora dintre catenele laterale din jurul grupării hemice, precum şi unele detalii din însuşi interiorul grupării hemice (pentru formula chimică a acestei grupări, vezi fig. 11.1).

Structura reprezentată în desen trebuie considerată deocamdată doar provizorie, identitatea şi poziţia exactă a unora dintre catenele laterale figurate nefiind încă definitiv precizate. Locul pe care catenele laterale reprezentate în figură (F2, F3 ... CD2 ... E9, E10 etc.) îl ocupă în structura primară este redat în tabelul 11.1. În figura de faţă legăturile covalente sînt reprezentate prin bastonaşe. Pentru a înţelege proprietăţile sterice (aşezarea spaţială) ale catenelor laterale, cititorul trebuie să-şi imagineze că machetele bastonaşelor din această figură ar fi înlocuite cu modelele moleculare corespunzătoare din tabelul 3.1. Molecula de oxigen (O_2), a cărei depozitare şi al cărei transport reprezintă în fond „rostul" întregii structuri a moleculei de mioglobină, este legată de partea de dedesubt a atomului de fier (Fe) din centrul grupării hemice (modificat după Kendrew, 1961).

pe ele însele, dar se presupunea întotdeauna că ele trebuie să fie încolăcite într-un mod mai mult sau mai puțin regulat și nu sub forma unui ghem încîlcit. Se pare totuși că interacțiunea dintre grupările catenelor laterale aflate de-a lungul unui lanț peptidic cu o anumită secvență va determina acest lanț să se încolăcească într-o dispunere tridimensională complexă și neregulată, caracteristică pentru secvența respectivă. Astfel, toate moleculele de mioglobină de balenă (care au structura primară redată în cap. 11) se vor încolăci exact ca în fig. 3.11. Presupunem că se va descoperi că alte proteine, cu secvențe diferite, se vor încolăci în alte forme, tot atît de complexe. (Singura proteină care a mai fost studiată tot atît de amănunțit pînă în prezent este hemoglobina, despre care vom discuta în paragraful următor.) Traseul lanțului peptidic din interiorul moleculei, așa cum este reprezentat în fig. 3.11 pentru cazul special al mioglobinei, poartă denumirea de structură *terțiară* a proteinei.

Înfățișarea unei molecule de proteină globulară, așa cum poate fi dedusă din aceste studii, este cea a unei molecule mari, mai mult sau mai puțin sferice sau elipsoidale, avînd o suprafață zbîrcită, neregulată, presărată cu o mare varietate de grupări chimice. Aceste grupări de pe suprafața proteinei pot fi atît cele ale catenelor laterale ale peptidului (redate în tabelul 3.1), cît și grupări prostetice (ca hemul mioglobinei), încastrate în structura proteinei.

Cînd proteinele acționează ca enzime, moleculele de substrat sînt legate temporar de suprafața proteinei. Existența unor diferențe de structură primară între două enzime sau între două proteine neenzimatice duce la deosebiri în structura lor tridimensională, la deosebiri în grupările de pe suprafața proteinelor și în aranjamentul exact al lor. Acesta este, credem, modul prin care deosebirile în structura primară (secvența de aminoacizi) se traduc prin deosebiri de funcție (problema este discutată mai amănunțit în cap. 4). Cunoscînd marea diversitate de grupări existente și de posibilități de aranjare spațială tridimensională a acestor grupări la suprafața proteinei, putem înțelege cum pot lua naștere sute de enzime diferite, cu specificitate variată, precum și o mare diversitate de proteine neenzimatice (cap. 2), printre care sutele de feluri de anticorpi, constituite toate din lanțuri peptidice a căror compoziție procentuală în aminoacizi

Scanned with OKEN Scanner

este oarecum asemănătoare, dar care diferă prin succesiunea acestora.

Am socotit nimerit ca, în zugrăvirea tabloului structurii moleculelor de proteină, să folosim termenii de structură secundară și terțiară, introduși de Linderstrøm-Lang cu mai mulți ani în urmă, într-o perioadă cînd se părea că există o diferență netă între aceste două aspecte ale structurii proteinelor. Astfel, fig. 3.8 reprezintă structura secundară α-elicoidală în timp ce imaginea mioglobinei, dedusă prin metodele de analiză cu raze X cu o putere separatoare relativ mică (fig. 3.11), reprezintă structura terțiară; această imagine nu este destul de detaliată pentru a se putea vedea ce fel de structură secundară se găsește în interiorul tubului. În schimb, în imaginea care se conturează în ultimul timp cu ajutorul metodelor ce folosesc o putere separatoare mare (fig. 3.12) și în care este definită cu precizie poziția fiecărui atom din moleculă, aspectele de structură secundară și terțiară se întrepătrund, ceea ce face ca astăzi acești termeni să nu mai fie atît de larg folosiți.

AGREGAREA SUBUNITĂȚILOR PROTEICE (STRUCTURA CUATERNARĂ)

Greutatea moleculară a unei proteine poate fi dedusă din presiunea osmotică a soluției de proteină, din viteza de difuziune a moleculelor sau din viteza sedimentării lor prin centrifugare. Ea este de fapt o măsură a mărimii unui fragment de proteină care, în soluție, se comportă ca o unitate. Se observă însă adesea că greutatea moleculară a unei proteine depinde de condițiile de pH și de concentrație salină. De exemplu, greutatea moleculară a hemoglobinei umane normale la pH $\sim$ 7 este aproximativ de 4 ori mai mare decît cea a mioglobinei, fiecare moleculă conținînd patru lanțuri peptidice și patru grupări de hem. Într-un mediu slab acid, moleculele de hemoglobină se scindează în două, fiecare parte conținînd două lanțuri peptidice și două grupări de hem.

Greutatea moleculară a unei proteine mai depinde și de procedeul folosit la extracția ei. Hemoglobina poate fi extrasă foarte ușor din globulele roșii (cap. 2) și greutatea ei moleculară în soluție de pH $\sim$ 7 este probabil aceeași cu cea pe care o are *in vivo*. În cazul majorității proteinelor însă nu știm în ce mă-

Scanned with OKEN Scanner

sură mărimea moleculei extrase și purificate, aflată în soluție, corespunde cu mărimea structurii în care proteina respectivă se află încorporată în celulă. Termenul de „moleculă de proteină" se aplică de obicei formei găsite la *p*H ~ 7, după extracție prin metode blînde. Trebuie totuși să ținem seama de faptul că alegerea acestor condiții este arbitrară și să avem în vedere că moleculele de proteine pot să se agrege cu ușurință, formînd molecule mai mari, geluri și fibre sau, dimpotrivă, să se desfacă în componente mai mici. Proteinele formează complexe cu lipidele (cap. 6) și cu acizii nucleici (cap. 9). *In vivo* ele se găsesc în mare măsură încorporate în structurile membranoase și nucleoproteice ale celulelor.

Deși adesea termenul de *subunitate* este folosit ori de cîte ori are loc desfacerea unor molecule proteice în părți componente mai mici, vom restrînge utilizarea acestui termen numai pentru *cele mai mici* unități pînă la care poate fi desfăcută o proteină prin tratamente blînde, adică fără rupere de legături covalente (chimice). Subunitățile unei molecule proteice sînt de obicei, în acest caz, lanțuri peptidice izolate, deși, în anumite cazuri, de exemplu al insulinei (fig. 3.4), o subunitate poate cuprinde două sau mai multe lanțuri unite prin legături S-S.

Molecula de hemoglobină este alcătuită din patru subunități. Studii recente de difracție cu raze X (Perutz și colab., 1960) au arătat că fiecare dintre aceste subunități este foarte asemănătoare cu molecula de mioglobină și că cele patru subunități din hemoglobina de cal sînt așezate după cum se vede în fig. 3.13. O comparație amănunțită între structura primară și cea terțiară a lanțurilor de mioglobină și de hemoglobină prezintă un deosebit interes și va fi discutată în cap. 11.

Complexitatea metodei de analiză, îndemînarea și experiența care au fost necesare pentru dobîndirea acestor rezultate pot fi judecate după faptul că Perutz, împreună cu o echipă de colaboratori din ce în ce mai mare, a consacrat acestei probleme aproape toată activitatea sa încă din anul 1937. Succesul a putut fi dobîndit prin perfecționarea tehnicii și datorită folosirii mașinilor moderne și rapide de calcul. Perspicacitatea și perseverența de care au dat dovadă Perutz și Kendrew în abordarea problemei extraordinar de dificile a analizării spectrelor de difracție cu raze X date de hemoglobină și mioglobină au fost însă larg răsplătite. O dată cu descifrarea structurii primare a acestor proteine, a

Scanned with OKEN Scanner

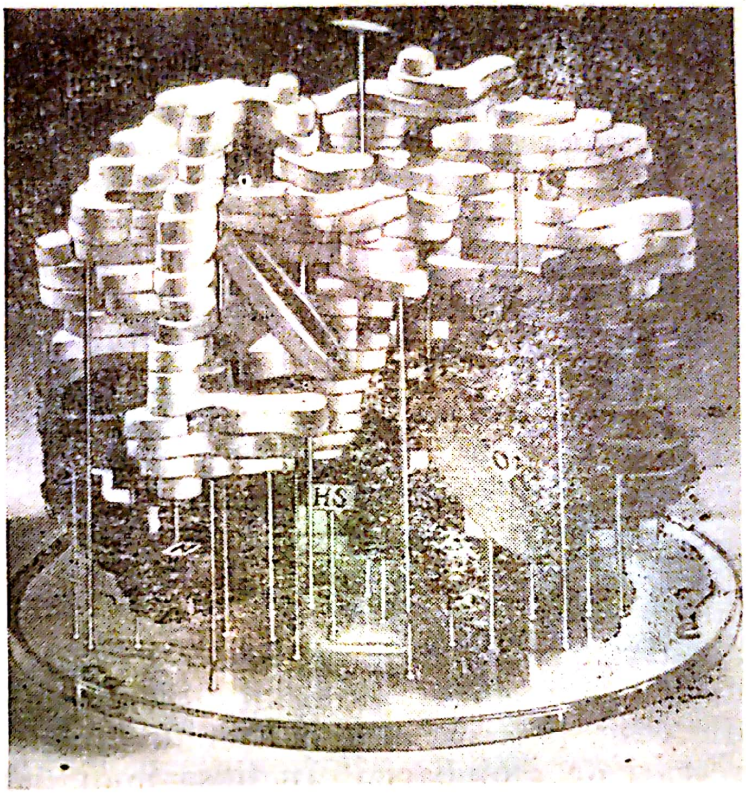
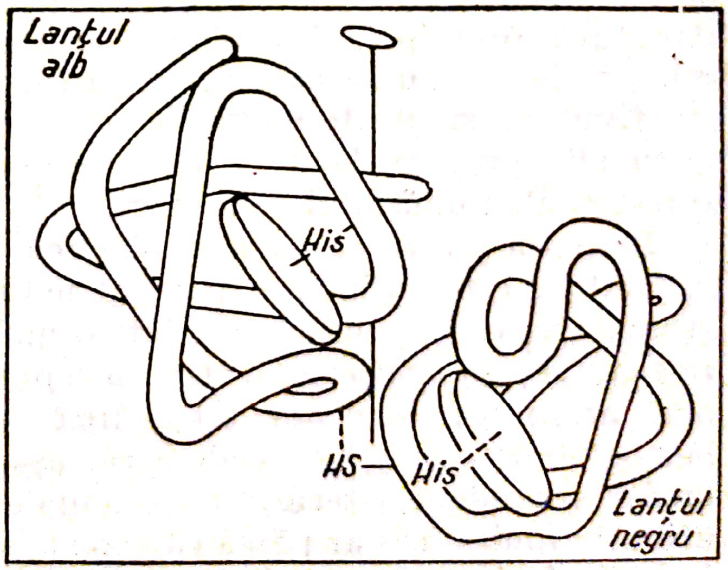


Fig. 3.13. Structura terţiară şi cuaternară a hemoglobinei.

Molecula de hemoglobină este alcătuită din două lanţuri α şi două lanţuri β (cap. 11), de fiecare lanţ fiind legată cîte o grupare prostetică hemică. Aşa cum reiese din desen, structura terţiară a acestor lanţuri este destul de asemănătoare cu cea a mioglobinei, deşi există unele mici deosebiri de încolăcire atît între lanţurile α şi β, cît şi între aceste lanţuri şi cel al mioglobinei, determinate de diferenţe în structura lor primară (tabelul 11.1). Fotografia arată cît de bine se îmbucă aceste lanţuri între ele, realizînd configuraţia aproximativ tetraedrică a structurii cuaternare a moleculei de hemoglobină. (Sensul dublu, dar fără legătură unul cu altul, al sufixului α duce la confuzii, dar, din nefericire, aceasta este acum nomenclatura încetăţenită : atît lanţurile α, cît şi cele β ale hemoglobinei conţin porţiuni de structură secundară în α-helix.) Modelul reprodus în fotografie reprezintă, ca şi modelul mioglobinei din fig. 3.11, zonele cu densitate electronică mare din moleculă adică structurile axiale ale lanţurilor peptidice (după Perutz şi colab., 1960).



Scanned with OKEN Scanner

devenit posibilă analizarea în detaliu a comportării fiziologice şi patologice a hemoglobinei (cap. 11) şi totodată aprecierea cu exactitate a poziţiei şi interacţiunii precise a fiecărui atom component al proteinei. Poate că tocmai acest mod de gîndire constituie trăsătura caracteristică a celor ce lucrează în domeniul biologiei moleculare.

Alte exemple de agregare a subunităţilor proteice, cu formare de structuri mai mari, vor fi date în cap. 4. Pînă în momentul de faţă încă nu ştim care este limita superioară de dimensiune pe care aparatul celular de sinteză a proteinelor o impune lanţurilor peptidice individuale. β-lactoglobulina, cu o greutate moleculară de 37 000, este alcătuită din două subunităţi; aceasta, ca şi rezultatele obţinute cu hemoglobina, sugerează că proteinele mai mari ar putea să fie adesea alcătuite din subunităţi cu o greutate moleculară de 12 000 pînă la 24 000 (lanţurile peptidice cuprinzînd 100 pînă la 200 de resturi de aminoacizi). Cu toate acestea, serumalbumina, cu o greutate moleculară apropiată de a hemoglobinei, pare a fi alcătuită dintr-un singur lanţ peptidic care, în acest caz, ar trebui să conţină aproximativ 600 de resturi de aminoacizi. În lipsa unor date amănunţite obţinute cu ajutorul difracţiei cu raze X, numărul de lanţuri peptidice din moleculele proteice se evaluează prin determinarea pe cale chimică a numărului de grupări peptidice terminale existente în molecula respectivă. Această metodă de evaluare este imprecisă; pe de o parte, grupările terminale pot fi mascate în interiorul structurii proteinei, devenind astfel areactive şi ducînd la o subapreciere a numărului de lanţuri existent; pe de altă parte, reactivul folosit poate să nu fie suficient de specific, reacţionînd şi cu alte grupări decît cu cele terminale şi ducînd la supraaprecieri ale numărului de lanţuri.

Bernal a arătat că dacă încolăcirea lanţului peptidic dintr-o subunitate este calificată drept structură secundară şi terţiară, atunci aşezarea subunităţilor într-o moleculă de proteină reprezintă un aspect *cuaternar* al structurii proteice, cum ar fi, de exemplu, aranjarea oarecum tetraedrică a subunităţilor în cazul hemoglobinei. Avînd în vedere că, aşa cum am arătat în paragraful precedent, termenii „secundar" şi „terţiar" au o utilitate limitată, s-ar părea că astăzi este necesar un termen mai potrivit decît „cuaternar". El a fost totuşi introdus aici, deoarece în paragrafele ulterioare vom avea nevoie de un asemenea termen

Scanned with OKEN Scanner

cu care să denumim acest aspect al structurii proteice şi care să arate în acelaşi timp că aşezarea şi interacţiunea dintre subunităţi reprezintă un grad superior de complexitate structurală.

Stadiul actual al cunoştinţelor noastre asupra structurii proteinelor globulare mici discutate pînă acum este rezumat în tabelul 3.4.

ASPECTELE DINAMICE ALE STRUCTURII PROTEINELOR

Tehnica de difracţie cu raze X reprezintă un instrument valoros şi precis de studiu al moleculelor dintr-un cristal, în care acestea sînt dispuse în aliniamente ce se repetă în mod regulat. În difracţie, cu cît zona cu dispoziţie regulată este mai întinsă, cu atît petele din spectrul de difracţie vor fi mai net delimitate. În cazul cristalelor cu dimensiuni foarte mici sau al unor structuri la care există imperfecţiuni în regularitatea alinierii, care prezintă întreruperi, spectrul de difracţie este mai estompat şi furnizează indicaţii mai sărace. De obicei, cu cît ne apropiem mai mult de structurile biologice adevărate, cu atît informaţiile pe care le putem obţine prin studiile de difracţie cu raze X sînt mai reduse. În celulele somatice, fibrele musculare sînt singurele componente intracelulare a căror dispoziţie *in vivo* este suficient de regulată pentru a permite obţinerea unor spectre de difracţie cu raze X ; în general, spectrele obţinute cu produse netratate (muşchi, teaca mielinică a nervilor, proteine fibroase) sînt relativ neprecise şi nu permit decelarea detaliilor de structură (fig. 3.14). În spectrele obţinute prin examinarea spermei, virusurilor şi acizilor nucleici extraşi se pot deslusi mai multe amănunte (fig. 3.15 şi 3.16). Proteinele cristalizate dau spectre cu foarte multe detalii (fig. 3.16).

Chiar dacă, pe baza spectrului de difracţie cu raze X, am dobîndit o imagine relativ completă a structurii moleculei proteice dintr-un cristal, trebuie să ne adresăm apoi şi unor tehnici mai puţin precise pentru a afla în ce măsură molecula respectivă îşi păstrează aceeaşi structură cînd trece în soluţie sau cînd se află în mediul caracteristic din interiorul celulei vii.

Există numeroase dovezi în favoarea părerii că, în proteinele globulare în stare nativă aflate în soluţie, lanţurile peptidice sînt îndoite şi încolăcite, formînd o structură compactă. În special evaluarea, prin determinarea rotaţiei optice, a proporţiei

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 3.4

Rezumatul cunoștințelor actuale asupra

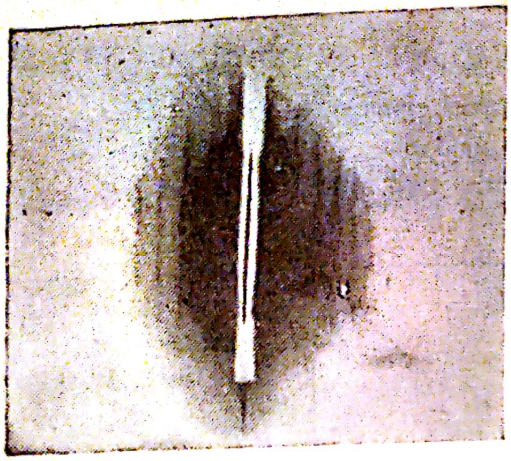
Proteina	Greutate moleculară și dimensiuni globale ale moleculei	Structură primară
Insulină	6 000	Complet cunoscută pentru cîteva specii. Două lanțuri cu 21 și 30 de resturi de aminoacizi unite prin două legături S—S. Buclă a lanțului cu 21 de aminoacizi realizată prin legătură S—S
Ribonuclează	15 000 5 × 3 × 2mμ	Complet cunoscută. Lanț unic cu 124 de resturi de aminoacizi, cu 4 legături S—S ce unesc diferite puncte ale lanțului
Proteina VMT	17 000 6 × 2 × 2mμ	Aproape complet cunoscută pentru tulpina sălbatică. Lanț unic cu 157 de resturi de aminoacizi. Diversele tulpini se deosebesc prin unii aminoacizi. Nu există legături S—S
Mioglobină	17 000 4 × 3,5 × 2mμ	Aproape complet cunoscută pentru mioglobina de balenă. Un singur lanț cu 151 de resturi de aminoacizi. O grupare hemică. Legături S—S absente
Hemoglobină	68 000 6,5 × 5,5 × 5mμ	Aproape complet cunoscută pentru hemoglobina umană. Două lanțuri cu 141 de resturi de aminoacizi, două cu 150. Variații ereditare ale resturilor în anumite puncte ale lanțurilor (v. cap. 11). Patru grupări hemice
β—lactoglobulina	37 000	Se cunoaște compoziția globală în aminoacizi
Serumalbumină	69 000	Se cunoaște compoziția globală în aminoacizi

Scanned with OKEN Scanner

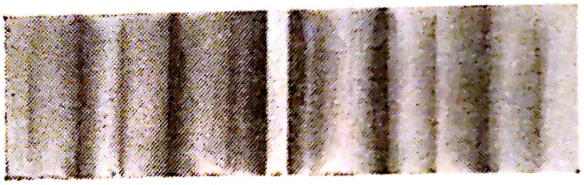
structurii unor proteine globulare

Structură secundară	Structură terţiară	Structură cuaternară
45—60% α—helicală	—	Unităţile cu gr. mol. 6 000 formează unităţi duble (dimeri) cu gr. mol. 12 000 în soluţii apoase
10—20% α—helicală	—	Nu se agregă
—	—	Se agregă dînd naştere unui tub gol pe dinăuntru (cap. 4)
70% α—helicală. Structura altor porţiuni cunoscută destul de amănunţit	Cunoscută (fig. 3.11)	Nu se agregă
70% α—helicală	Cunoscută (fig. 3.13)	Dispunere tetraedrică a patru subunităţi
—	—	Două subunităţi (dimer)
—	—	—

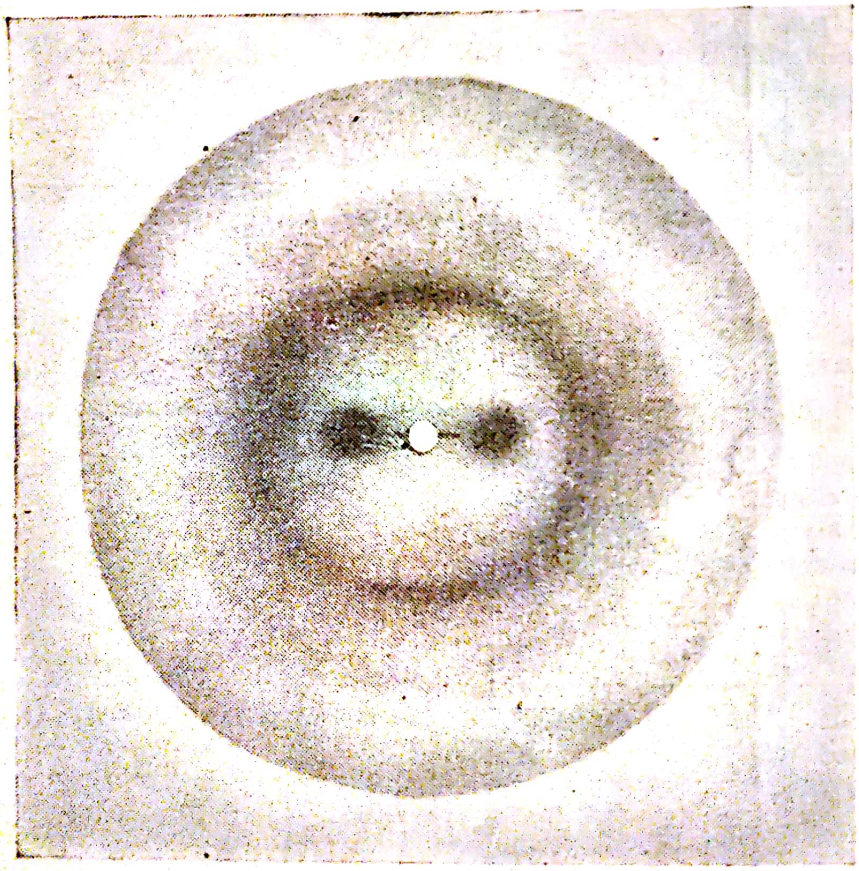
Scanned with OKEN Scanner



Mușchi
(mușchi croitor
de broască.
După Huxley, 1953)



Nerv mielinizat
(nerv sciatic de
șobolan. După
Finean, 1962)

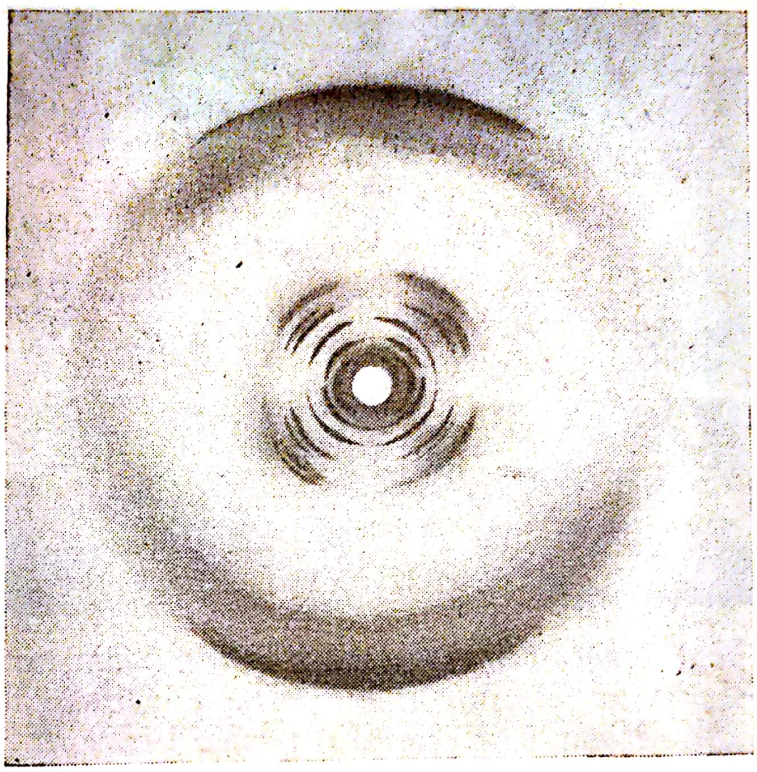


Fir de păr
(angora)
(După Mercer,
1961)

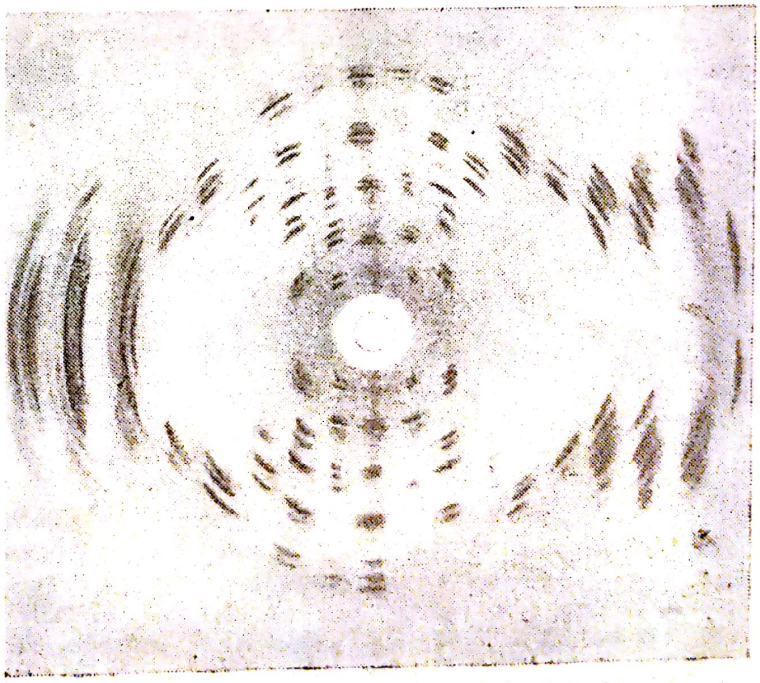
Fig. 3.14. Spectrele de difracție cu raze X date de preparate proaspete, netratate, de mușchi, nerv mielinic și păr.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 3.15. Spectrele de difracţie cu raze X date de spermă (care, în afară de orientare, nu a suferit nici un alt tratament prealabil) şi de un filament obţinut prin întinderea unei soluţii vîscoase a unui extract de ADN (în asemenea filamente, cea mai mare parte a moleculelor sînt orientate în lungul filamentului).

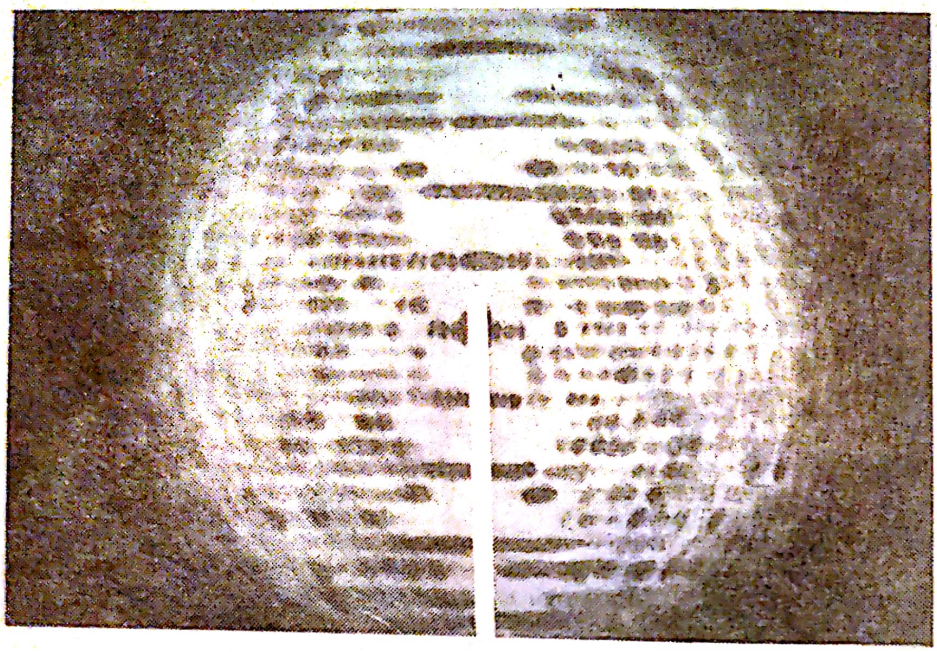


Spermă (După Wilkins, 1956)



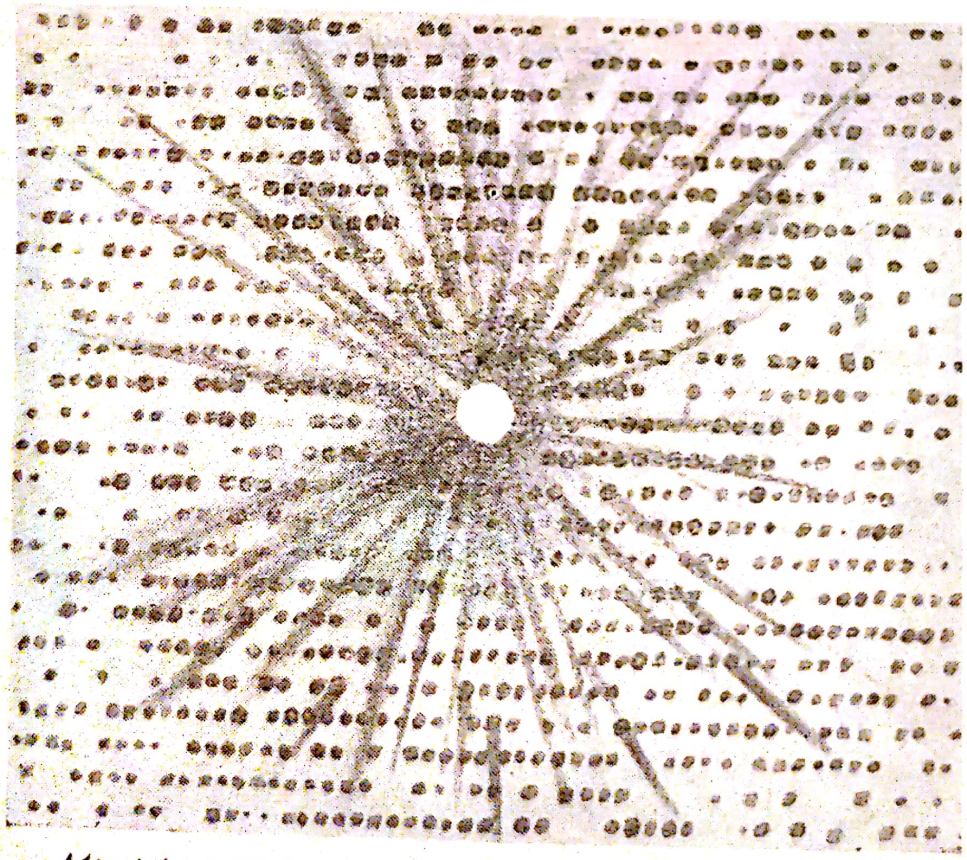
ADN (După Langridge şi col., 1957)

Scanned with OKEN Scanner



VMT (După Franklin și Holmes, 1958)

Fig. 3.16. Spectrele de difracție cu raze X date de un gel de virus al mozaicului tutunului (VMT) și de un cristal de mioglobină.

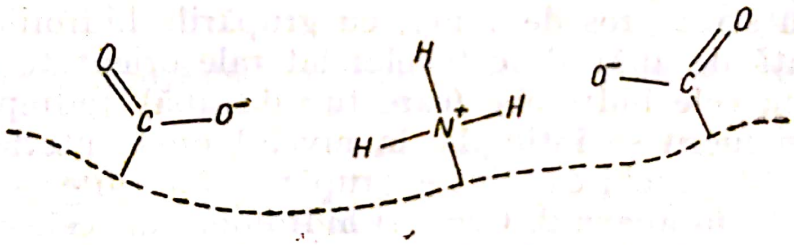


Mioglobină (Fotografie prin bunăvoința Dr. J.C. Kendrew)

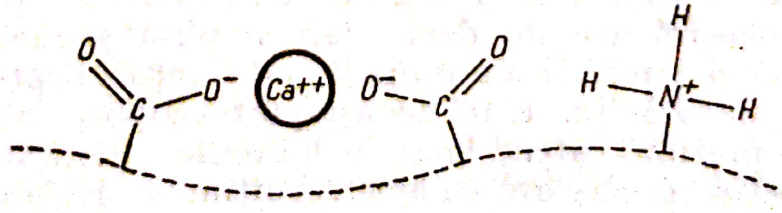
Scanned with OKEN Scanner

de lanţuri de mioglobină şi hemoglobină înfăşurate în formă de α-helix din moleculele aflate în soluţie (tabelul 3.3) concordă cu imaginea moleculei în stare cristalină dedusă prin studiile de difracţie cu raze X. Pare deci justificat să presupunem că mioglobina şi hemoglobina îşi păstrează şi în soluţie o structură foarte asemănătoare cu aceea evidenţiată în cazul cristalelor prin studii de difracţie cu raze X, deşi în soluţie moleculele se pot desfăşura într-o oarecare măsură, datorită unui grad de libertate de mişcare a capetelor şi a porţiunilor nespiralate ale structurii axiale a peptidului.

În fig. 3.9 se poate observa că α-helixul permite o considerabilă libertate de mişcare a catenelor laterale. În zonele în care două regiuni spiralate sau două subunităţi intră în contact de-a lungul lor, este de presupus că se va produce o întrepătrundere a catenelor lor laterale şi că acestea vor adopta acele poziţii reciproce care sînt cele mai favorabile interacţiunii dintre grupările catenelor laterale respective. La suprafaţa moleculei însă, poziţia exactă a acestor grupări poate fi determinată de condiţiile din soluţie. Astfel, în cazul unei proteine dizolvate în apă distilată, grupările negative şi pozitive de la suprafaţa moleculei vor avea tendinţa să se amestece la întîmplare:



În prezenţa ionilor de calciu însă, poate avea loc o rearanjare a grupărilor de la suprafaţă, pentru a permite grupărilor — COO — să lege ionul bivalent:



Va trebui deci să aducem o uşoară modificare imaginii despre suprafaţa moleculei de proteină descrise mai sus (zbîrcită şi presărată cu o diversitate de grupări), în sensul că trebuie să permitem acestor grupări un oarecare grad de „agitare" şi de schimbare a poziţiei. Această libertate de mişcare poate fi un element important, permiţînd grupărilor proteinei să realizeze cu precizie conformaţia tridimensională necesară pentru legarea unor molecule de substrat sau a unor antigene ori pentru adsorbţia pe membrane celulare.

DESFĂŞURAREA MOLECULELOR DE PROTEINĂ LA NIVELUL UNOR INTERFEŢE

Trebuie să descriem acum pe scurt desfăşurarea moleculelor de proteină la nivelul unor interfeţe aer-apă sau ulei-apă. Aceasta este necesar pentru a completa înţelegerea structurii proteinelor, cît şi pentru a avea premisa necesară discutării, în cap. 6, a structurii proteinelor încorporate în membranele celulare. La nivelul interfeţei dintre aer şi o soluţie apoasă de proteină se formează o peliculă superficială de proteină, în care moleculele acesteia suferă un grad important de denaturare, desfăşurîndu-se pentru a forma un strat gros de 1 mμ, cu grupările hidrofile (care au afinitate faţă de apă) ale catenelor laterale orientate către faza apoasă şi cu cele hidrofobe (care fug de apă) îndreptate spre aer. Acelaşi lucru se întîmplă la nivelul unei interfeţe dintre ulei şi apă. (Deosebirea dintre grupările hidrofile şi hidrofobe este discutată în anexa 2. Grupări hidrofobe sînt cele care conţin numai atomi de carbon şi de hidrogen şi nici o grupare capabilă să formeze legături de hidrogen cu moleculele de apă.)

Este evident că în cazul unor proteine globulare, ca mioglobina sau hemoglobina, această desfăşurare presupune în mod obligatoriu o remaniere importantă a structurii terţiare şi cuaternare, toate segmentele lanţurilor polipeptidice ajungînd să fie cuprinse în stratul de 1 mμ de la nivelul de separaţie. Nu ştim în ce măsură această denaturare implică şi modificări ale structurii secundare, adică a proporţiei de lanţuri peptidice aflate sub formă de α-helix. Este de aşteptat ca porţiunile de lanţ peptidic ce prezintă catene laterale hidrofile alternînd cu altele hidrofobe să se desfăşoare complet. Porţiunile de lanţ polipep-

Scanned with OKEN Scanner

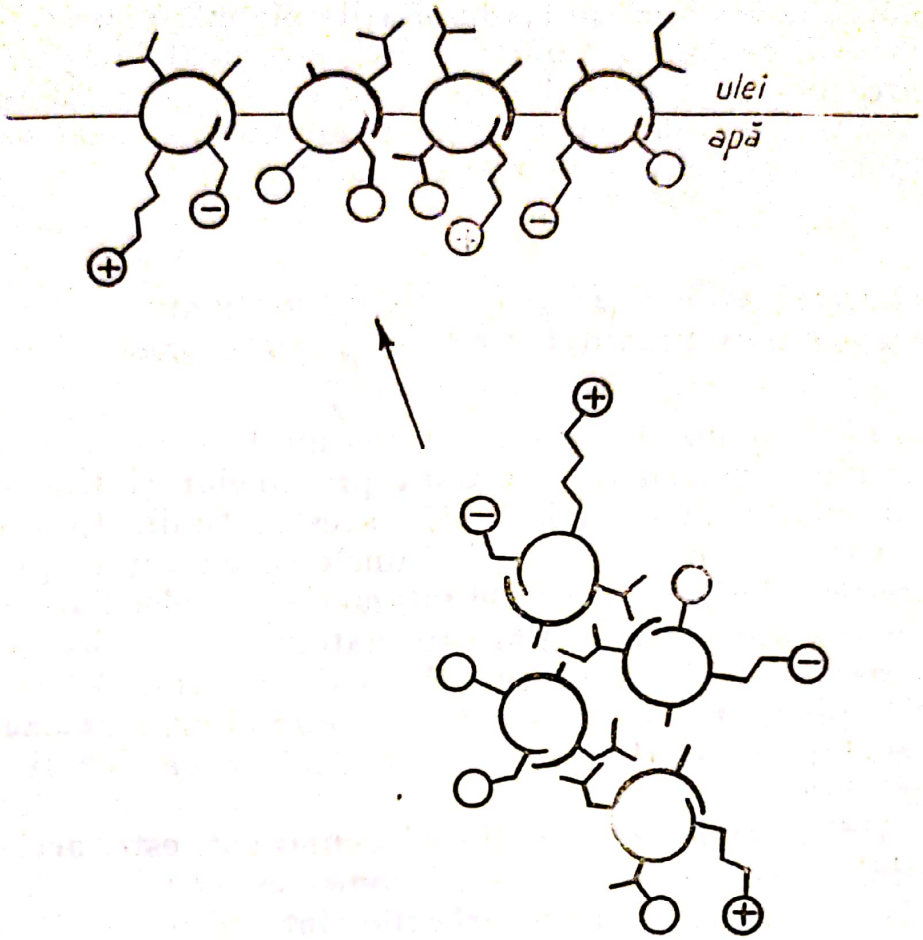


Fig. 3.17. Desen reprezentînd schematic desfăşurarea unor molecule proteice la nivelul unei interfeţe ulei-apă şi aer-apă.

Proteinele sînt reprezentate prin α-helixuri (văzute de sus, ca în desenul schematic din fig. 3.9.), catenele laterale fiind redate prin simbolurile „stenografice" din tabelul 3.1. Schema redă modul de desfăşurare care trebuie să se producă pentru ca o proteină globulară să se dispună sub forma unei pelicule groase de 1 mμ, avînd grupările hidrofobe (hidrocarbonice) aşezate predominant în faza uleioasă sau în aer, iar cele hidrofobe (—○, —⊕, —⊖) predominant în faza apoasă. Lanţurile peptidice din molecula desfăşurată sînt reprezentate în forma de α-helix pe baza experienţelor efectuate de Malcolm cu peptide compuse dintr-un număr restrîns de aminoacizi. Nu se cunoaşte de fapt măsura în care se păstrează structura secundară în α-helix a unei proteine globulare atunci cînd aceasta se desfăşoară în modul arătat. Pentru a scoate în evidenţă fenomenul cu mai multă claritate, toate catenele laterale hidrocarbonice din figura de faţă se găsesc în faza uleioasă sau în interiorul moleculei de proteină globulară, grupările polare aflîndu-se toate în faza apoasă. În realitate, tendinţa aceasta spre separarea absolută a celor două tipuri de grupări din catenele laterale nu poate fi niciodată satisfăcută în întregime.

tidic la care secvenţa catenelor laterale a făcut ca majoritatea grupărilor hidrofobe să se situeze de o parte a α-helixului şi majoritatea celor hidrofobe de cealaltă îşi vor păstra, după toate aşteptările, conformaţia spiralată şi la nivelul interfeţei. La nivelul unor astfel de interfeţe este probabil că lanţurile peptidice

individuale au, ca și în subunitățile globulare, o configurație parțial α-elicoidală și parțial mai neregulat înfășurată. Desfășurarea unei proteine globulare cu o remaniere completă a structurii terțiare, dar cu modificări minime ale celei secundare este reprezentată schematic în fig. 3.17.

SPECULAȚII ASUPRA NATURII FORȚELOR IMPLICATE IN REALIZAREA STRUCTURII TERȚIARE ȘI CUATERNARE

Pînă acum, în acest capitol au fost prezentate în special studiile experimentale asupra proteinelor și tipul de structură moleculară care a reieșit din aceste studii. În acest paragraf vom trece la unele discuții și unele speculații asupra modului în care principiile de bază ale interacțiunii moleculare explică determinarea structurii terțiare și cuaternare a moleculelor proteice. Această discuție este cu atît mai importantă, cu cît aceleași principii stau la baza structurii ribozomilor, cromozomilor, membranelor și celorlalte structuri celulare ce vor fi discutate în capitolele următoare.

Un fapt de observație binecunoscut este acela că apa și uleiul nu se amestecă ; acest fenomen este analizat la nivel molecular în anexa 2. Hidrocarburile sînt hidrofobe. Proporția mare de catene laterale hidrocarbonice din majoritatea proteinelor (30 pînă la 50%, vezi tabelul 3.2) face ca un α-helix lung și drept care nu suferă o încolăcire terțiară sau o agregare să nu fie o formă favorabilă pentru o proteină în mediu apos. Lanțurile peptidice vor avea, dimpotrivă, tendința să se alăture iar spiralele lungi să se îndoaie, după cum se arată în fig. 3.18, reducînd astfel zona hidrofobă de la suprafața moleculei.

Îndoirea unui α-helix, așa cum se arată în fig. 3.18(B), presupune desfacerea, pe o porțiune scurtă, a structurii spiralate. Energia potențială termodinamică necesară ruperii a aproximativ șase legături de hidrogen intracatenare pentru a permite α-helixului să se îndoaie în acest fel într-un mediu apos a fost apreciată la 5—10 kcal/mol. (Energia potențială termodinamică și modificările de energie potențială legate de ruperea legăturilor de hidrogen intracatenare sînt definite și discutate în anexa 3.) S-a evaluat că scăderea de energie potențială termodinamică corespunzînd trecerii oricărei catene laterale hidrocarbonice din

Scanned with OKEN Scanner

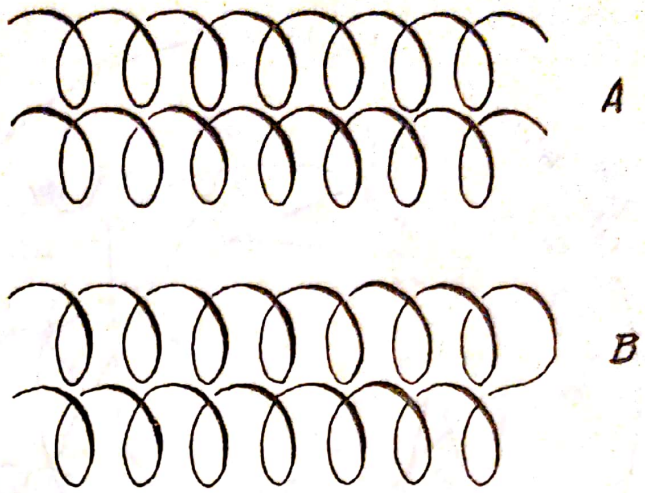


Fig. 3.18. Schemă reprezentînd agregarea a două α-helixuri (*A*) și îndoirea unui α-helix, ca rezultat al interacțiunilor catenelor laterale (*B*).

faza apoasă într-un mediu pur hidrocarbonic este de 3—5 kcal/mol. Ca atare dacă, atunci cînd se îndoaie α-helixul, sînt aduse într-un mediu hidrocarbonic trei sau mai multe catene laterale hidrocarbonice (sau dacă un număr corespunzător mai mare de asemenea catene este adus într-un mediu parțial hidrocarbonic) cîștigul de energie potențială termodinamică va fi mai mult decît suficient pentru a compensa modificarea de energie potențială cerută de ruperea structurii elicoidale la nivelul îndoiturii, făcînd astfel ca forma de ac de păr să fie mai avantajoasă din punct de vedere energetic. Acești factori hidrofobi pot fi suficienți, la temperaturi de 20—37 °C, pentru a menține alăturate, ca în schema din fig. 3.18 *A*, două α-helixuri alcătuite fiecare, să zicem, din 50 pînă la 100 de resturi de aminoacizi și conținînd 30—50% catene laterale hidrocarbonice.

Anumite secvențe de resturi de aminoacizi fac ca această acțiune să fie și mai pronunțată. Astfel, dacă secvența cuprinsă între două legături S-S ale unuia din lanțurile insulinei este dispusă sub formă de α-helix, ea aduce majoritatea catenelor laterale hidrocarbonice de o parte a acestuia (fig. 3.19). Acolo unde acest lucru se întîmplă pe anumite porțiuni ale unui lanț peptidic lung, este evident că din punct de vedere energetic pentru lanțul respectiv va fi foarte avantajos să sufere o oarecare încolăcire care să aducă aceste porțiuni una în vecinătatea celeilalte. Acest tip de acțiune are probabil importanță în determinarea structurii terțiare a mioglobinei, întrucît gruparea hemică hidrofobă (fig. 11.1) se găsește așezată într-un „buzunar" căptu-

Scanned with OKEN Scanner

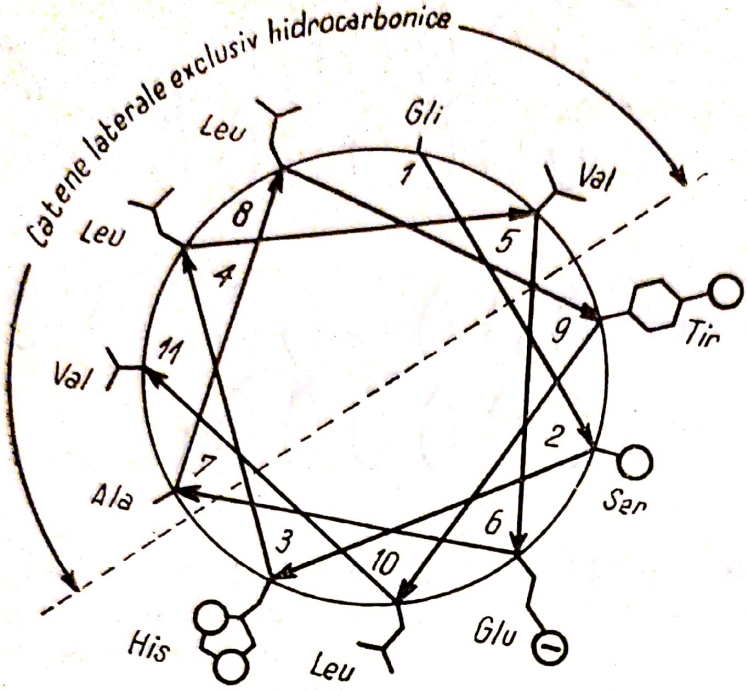


Fig. 3.19. Schemă arătînd modul în care s-ar dispune catenele laterale ale segmentului peptidic de 11 resturi de aminoacizi dintre legăturile S—S ale lanţului lung de insulină (fig. 3—4), dacă acest segment ar forma trei spire ale unui α-helix.

Este o reprezentare schematică a helixului văzut în lungul axului său. Toate catenele laterale situate de o parte a acestei porţiuni de helix vor fi hidrofobe (catenele laterale sînt reprezentate prin simbolurile „stenografice" din tabelul 3.1.)

şit cu grupări hidrofobe. Desfăşurarea moleculelor proteice la nivelul unei interfeţe aer-apă sau ulei-apă ilustrează şi ea importanţa efectelor hidrofobe în menţinerea structurii native a proteinelor globulare în soluţie apoasă.

Un alt factor care va lua parte într-o oarecare măsură la determinarea structurii terţiare este atracţia şi respingerea electrostatică dintre grupările cu încărcătură electrică din catenele laterale. Grupările ionice sînt puternic hidrofile şi ca atare ne vom aştepta ca ele să se găsească predominant la suprafaţa moleculei şi în măsură mai redusă în interiorul ei. Poziţia cea mai favorabilă din punct de vedere energetic a acestor grupări este asigurată atunci cînd grupările pozitive şi negative sînt amestecate în mod relativ uniform la suprafaţa moleculei. Atracţia dintre grupările opuse astfel repartizate va fi unul dintre factorii care tind să adune lanţurile peptidice ale unei proteine într-o configuraţie compactă. Dacă *p*H-ul unei soluţii de proteine este deplasat către aciditate sau către alcalinitate faţă de punctul ei izoelectric, încărcătura liberă a moleculelor creşte, devenind pozitivă în soluţiile acide în care sînt neutralizate grupările $-COO^-$ şi negativă în soluţiile alcaline în care se produce neutralizarea grupărilor bazice. Forţele de respingere născute din

Scanned with OKEN Scanner

această creştere a încărcăturii libere de la suprafaţa moleculelor sînt principalul factor răspunzător de denaturarea proteinelor prin acizi şi alcali.

Deşi printre factorii care menţin lanţurile peptidice într-o poziţie îndoită trebuie incluse şi legăturile S—S, acestea nu sînt esenţiale pentru formarea unei configuraţii terţiare stabile. Mioglobina şi hemoglobina nu conţin legături S—S.

Principalele forţe care duc la agregarea subunităţilor de proteină (structura cuaternară) sînt probabil tot aceleaşi pe care le-am discutat mai sus, adică natura hidrofobă a catenelor laterale hidrocarbonice şi forţele de atracţie şi respingere electrostatică dintre grupările ionizate. Forma adoptată de un lanţ peptidic într-o moleculă proteică mică sau într-o subunitate a unei molecule mai mari este, în ultimă instanţă, un compromis. Nu toate porţiunile hidrocarbonice din moleculă pot fi înconjurate de un mediu pur hidrocarbonic, nu se pot forma toate legăturile de hidrogen care ar fi posibile în cadrul structurii axiale elicoidale a peptidului, nu toate grupările ionizate pot ajunge faţă în faţă pentru a reduce la minimum energia potenţială electrostatică. Este de aşteptat ca în urma alăturării unor subunităţi creşterea interacţiunilor dintre grupările catenelor laterale să permită adeseori realizarea unui compromis mai favorabil. În cazul în care subunităţile mai prezintă catene laterale hidrocarbonice superficiale, venirea în contact a acestor subunităţi pe o anumită porţiune din suprafaţa lor duce la reducerea întinderii zonelor de contact dintre apă şi grupările hidrocarbonice. Grupările ionizate ale subunităţilor în contact se pot întrepătrunde. Ambii factori vor favoriza agregarea. Alţi factori vor acţiona, dimpotrivă, în sens contrar. De exemplu, agitaţia termică şi forţele de respingere dintre moleculele de proteine purtînd aceeaşi încărcătură electrică liberă vor tinde să împiedice agregarea. Coagularea sîngelui, proces discutat în cap. 4, este rezultatul tulburării unui echilibru ce există între acţiunea unor asemenea factori contradictorii asupra unei anumite proteine, fibrinogenul.

În acest paragraf ne-am referit la „forma cea mai favorabilă din punct de vedere energetic" pe care o poate adopta un lanţ polipeptidic sau un agregat de asemenea lanţuri. După cum se arată mai pe larg în anexa 3, forma cea mai convenabilă din punct de vedere energetic, în care energia potenţială termodinamică atinge o valoare minimă, este reprezentată de configu-

Scanned with OKEN Scanner

rația pe care o moleculă sau un agregat de molecule tinde să o îmbrace în starea de echilibru. Studiul celulelor vii este complicat prin aceea că moleculele lor nu se află întotdeauna într-o stare de echilibru termodinamic reversibil, dar nu avem nici un motiv să credem că procesele biologice implică vreo abatere de la legile termodinamicii, deduse din studiul unor procese fizice sau chimice mai simple. Este de presupus că încolăcirea și agregarea lanțurilor polipeptidice și chiar agregarea mai departe a moleculelor mari ce duce la formarea cromozomilor, membranelor celulare etc. se produc în mod spontan în condițiile precise existente în celula vie. (Aceste condiții, precum și corelația lor cu sinteza proteinelor sînt discutate amănunțit în cap. 12.)

Factorii care determină detaliile structurale ale tuturor formațiilor celulei sînt, în primul rînd, legăturile de hidrogen, efectele de hidrofobie și forțele electrostatice, pe care le-am analizat în calitatea de factori răspunzători ai detaliilor de structură ale proteinelor. Dat fiind că efectele de hidrofobie sînt rezultatul formării unor legături de hidrogen între moleculele de apă și întrucît legăturile de hidrogen sînt predominant de natură electrostatică, rezultă că structura și modurile de interacțiune ale moleculelor mari sînt în mare măsură determinate de distribuția sarcinii electrice pe grupările lor moleculare și pe moleculele de apă ce le înconjură. Trebuie avut totuși în vedere că noțiunea de „sarcină electrică" și imaginea simplistă a atracției dintre încărcăturile de semn opus și a respingerii dintre cele de același semn reprezintă doar o aproximare a tabloului forțelor de atracție și respingere dintre particulele fundamentale care alcătuiesc atomii. Pentru a înțelege pînă la capăt detaliile interacțiunii moleculare este necesară o analizare mai precisă a acestor forțe (anexa 2). Forțele ce determină interacțiunea dintre particulele fundamentale se dovedesc a fi atît de subtile, încît dau impresia că provoacă în mod spontan condensarea materiei, ducînd la formarea stelelor, planetelor, moleculelor mari, celulelor vii și ... oamenilor. Stadiul cel mai precoce al evoluției biomoleculelor, originea vieții, sînt discutate în anexa 6; alte aspecte evoluționiste ale biologiei moleculare sînt menționate în capitolele următoare. În capitolul ce urmează vom discuta felul în care subunitățile proteice se agregă la rîndul lor, dînd naștere structurilor celulare mai mari.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4

STRUCTURILE PROTEICE MARI ȘI RAPORTUL DINTRE STRUCTURA ȘI FUNCȚIILE PROTEINELOR

Capitolul 3 a fost consacrat prezentării principiilor structurii proteinelor. S-a început prin cercetarea felului în care structura primară a proteinelor determină parțial, dacă nu chiar în întregime, încolăcirea tridimensională a lanțurilor peptidice *in vivo*, precum și modul de agregare a acestor lanțuri încolăcite, cu formarea unor molecule mai mari. În capitolul de față ne vom ocupa de forme mai ample de agregare a subunităților, ce duc la formarea de tuburi și învelișuri sferice sau aproape sferice, goale pe dinăuntru. Vom discuta apoi structura unor proteine a căror compoziție este limitată la un număr redus de specii de aminoacizi sau atipică, așa cum sînt mătasea sau colagenul, la care structura secundară diferă de α—helix și la care lanțurile peptidice se leagă sau se răsucesc laolaltă, ducînd la formarea de fibre. Vor fi menționate pe scurt cheratinele, la care gradul înalt de solidarizare a lanțurilor peptidice prin legături S—S duce la formarea unor structuri aparte, cum sînt unghiile, ghearele, copitele, părul, lîna, precum și a structurii ușoare, brăzdate de nervuri, a penelor. Vor fi apoi discutate în amănunt anumite aspecte ale funcției proteinelor: modul în care acționează fibrele de colagen ca puncte de condensare pentru depunerea de substanță osoasă, mecanismul acțiunii enzimelor, precum și interacțiunea dintre actină și miozină în contracția musculară.

COMPONENTA PROTEICĂ A VIRUSULUI MOZAICULUI TUTUNULUI

Birefringența de scurgere și alte proprietăți ale suspensiilor de virus al mozaicului tutunului (VMT) arată că particulele acestuia sînt lungi și subțiri; dimensiunile lor, așa cum apar

Scanned with OKEN Scanner

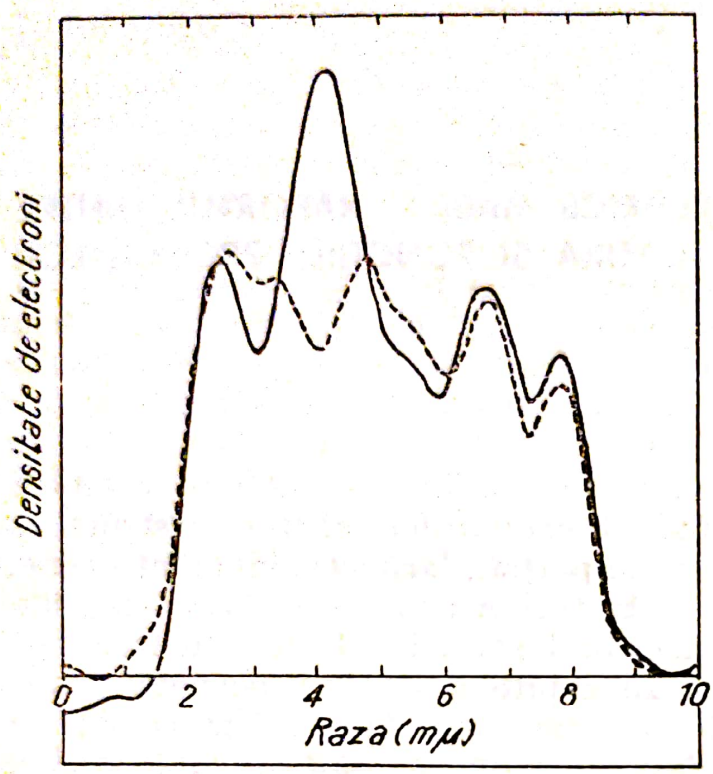


Fig. 4.1. Distribuția radiară a densității electronilor, determinată, prin studii de difracție cu raze X, în cazul particulei de virus al mozaicului tutunului (VMT) (linia continuă) și al proteinei VMT reagregate în absența componentei de acid ribonucleic a virusului (linia punctată) (după Franklin și Holmes, 1958).

pe microelectronografii, sînt de aproximativ 300 mμ × 17mμ. Examinarea la microscopul electronic permite decelarea anumitor detalii structurale ale acestor particule, dar vom descrie mai întîi contribuțiile mai importante aduse în acest sens de studiile de difracție cu raze X. Suspensiile suficient de concentrate de VMT prezintă un fenomen curios: suspensiile se separă spontan în două faze (ca rezultat al efectelor entropiei ce însoțesc restrîngerea libertății de mișcare a particulelor alungite, cauzată de particulele vecine). Faza inferioară, care are aspectul unui gel și este foarte concentrată, cuprinde zone paracristaline delimitate (tactoizi) în care particulele sînt orientate în șiruri paralele. Gelurile concentrate de VMT permit astfel obținerea unor spectre de difracție cu raze X foarte detaliate (fig. 3.16) studiate de Watson, Rosalind Franklin și alții. Distribuția radiară a densificărilor electronice, dedusă din analiza cu ajutorul razelor X, arată că particula de VMT este un tub gol pe dinăuntru, canalul central avînd un diametru de aproximativ 4 mμ (fig. 4.1).

Cercetări de fizică și chimie au arătat că greutatea moleculară a unei particule de VMT este de aproximativ 40×10^6,

Scanned with OKEN Scanner

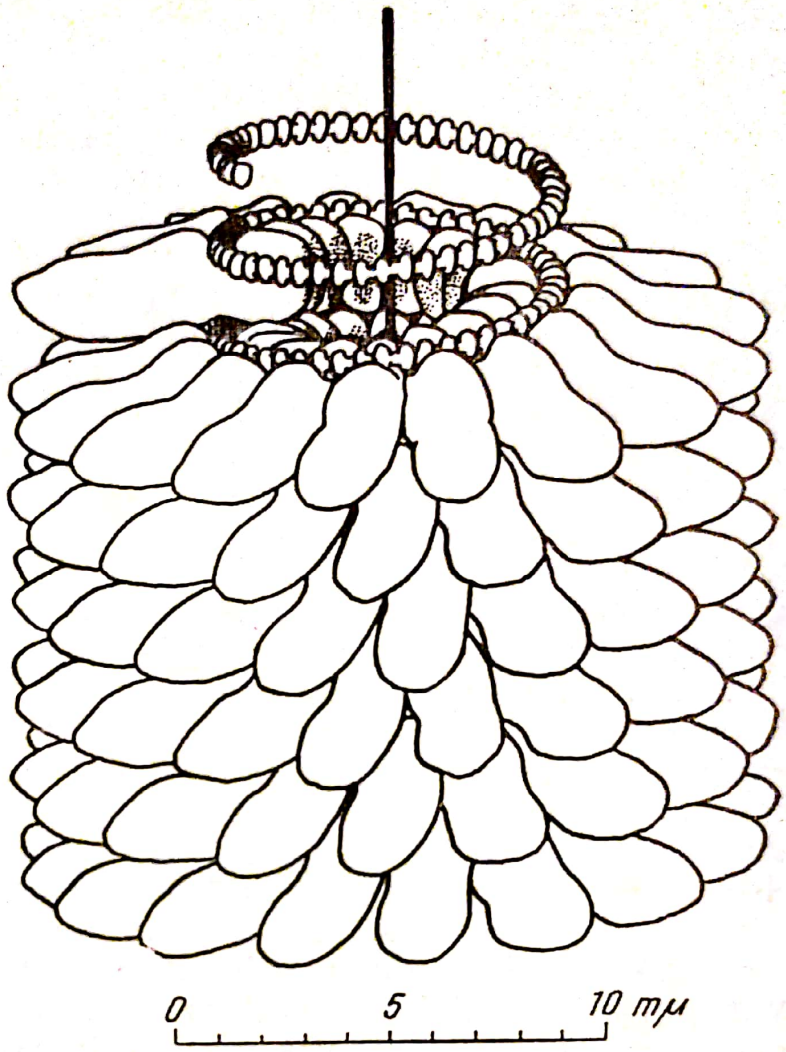


Fig. 4.2. Reprezentare schematică a structurii particulei de virus al mozaicului tutunului, în lumina contribuţiilor aduse de rezultatele studiilor de difracţie cu raze X (vezi text).

Pentru mai multă claritate, o parte din lanţul de ARN a fost reprezentată fără scheletul de proteină care îi serveşte drept suport, cu toate că, dacă subunităţile proteice ar fi îndepărtate din structura virusului, ARN nu şi-ar mai păstra forma elicoidală. De-a lungul lanţului de ARN este figurată schematic succesiunea bazelor. Fiecare dintre subunităţile de proteină reprezentate în acest desen conţine un singur lanţ peptidic încolăcit, a cărui structură primară este cea redată în fig. 3.6 (sau o structură primară foarte asemănătoare, în cazul diferitelor tulpini) (după Klug şi Caspar, 1960).

fiind alcătuită din 94,5% proteină şi 5,5% acid ribonucleic (ARN). În soluţii slab alcaline, particulele se desfac şi astfel pot fi separate de ARN fragmente proteice cu o greutate moleculară relativ scăzută (~100 000). Dacă se scade apoi din nou *p*H-ul, fragmentele acestea de proteină se reasamblează, chiar în absenţa ARN, formînd tuburi ce au aceleaşi diametre interior şi exterior ca şi virusul intact (fig. 4.1). Cercetări amănunţite cu raze X au arătat că, atît la virusul intact, cît şi la forma reagregată, componenta proteică este alcătuită din subunităţi avînd fiecare dimensiunile de aproximativ $6 \times 2 \times 2 m\mu$ (greutate moleculară ~17 000), asamblate după cum se arată în fig. 4.2, pentru a forma o structură elicoidală în care $16\frac{1}{3}$ sub-

Scanned with OKEN Scanner

unităţi alcătuiesc o spiră, respectiv 49 de subunităţi —trei spire. În particula intactă de VMT se găsesc dispuse în acest mod cca. 2 200 de subunităţi, ce formează un tub lung de 300 mμ. (Fragmentele cu greutate moleculară ~ 100 000 din care poate fi reconstituit tubul trebuie să conţină cîte şase subunităţi fiecare.)

Componenta de ARN a virusului este un lanţ lung monocatenar de acid nucleic, iar din compararea spectrelor de distribuţie radiară a densităţii electronice obţinute cu virusul intact şi cu proteina reagregată (fig. 4.1) rezultă că, în virusul intact, ARN este situat la o distanţă de 4mμ de axul particulei virale. Lanţul de ARN descrie o spirală printre subunităţile de proteină, aşa cum se vede în fig. 4.2.

În imaginile electronoptice obţinute prin tehnica ,,contrastului negativ'' se poate observa cu claritate forma tubulară atît a virusului, cît şi a proteinei reagregate, iar în imaginile proteinei reagregate aproape că se pot distinge subunităţile (fig. 4.3). Tehnica ,,contrastului negativ'' constă în adăugarea la o suspensie de virus sau de alte particule a unei substanţe electrondense, cum este fosfotungstatul de sodiu: o picătură din această suspensie se aşază pe o peliculă fină cu rol de suport, întinsă pe o grilă pentru preparate de microscopie electronică şi este lăsată să se usuce. În cursul procesului de uscare, substanţa densă se adună în jurul particulelor, o parte din ea rămînînd, de exemplu,în interiorul tubului de proteină a VMT, dînd imagini de tipul celor reproduse în fig. 4.3. (Descrierea microscopului electronic şi a modului în care formează imaginea electronică se pot găsi în anexa 4).

Structura primară a proteinei VMT a fost deja discutată în cap. 3. Subunităţile VMT, avînd fiecare o greutate moleculară de ~ 17 000, conţin un singur lanţ cu 157 de resturi de aminoacizi a căror secvenţă este cunoscută (fig. 3.6). Nu s-a făcut încă o determinare a conţinutului acestei proteine în porţiuni nu aşezare în α—helix şi nu ştim încă nimic despre detaliile structurii ei secundare şi terţiare. Este de presupus totuşi că fiecare lanţ de cîte 157 de resturi de aminoacizi trebuie să fie încolăcit şi înfăşurat sub forma unui ghem compact pentru a realiza subunităţile de $6\times2\times2$ mμ puse în evidenţă de analiza prin difracţie cu raze X.

α—helixul, în măsura în care este prezent în proteina VMT,

Scanned with OKEN Scanner

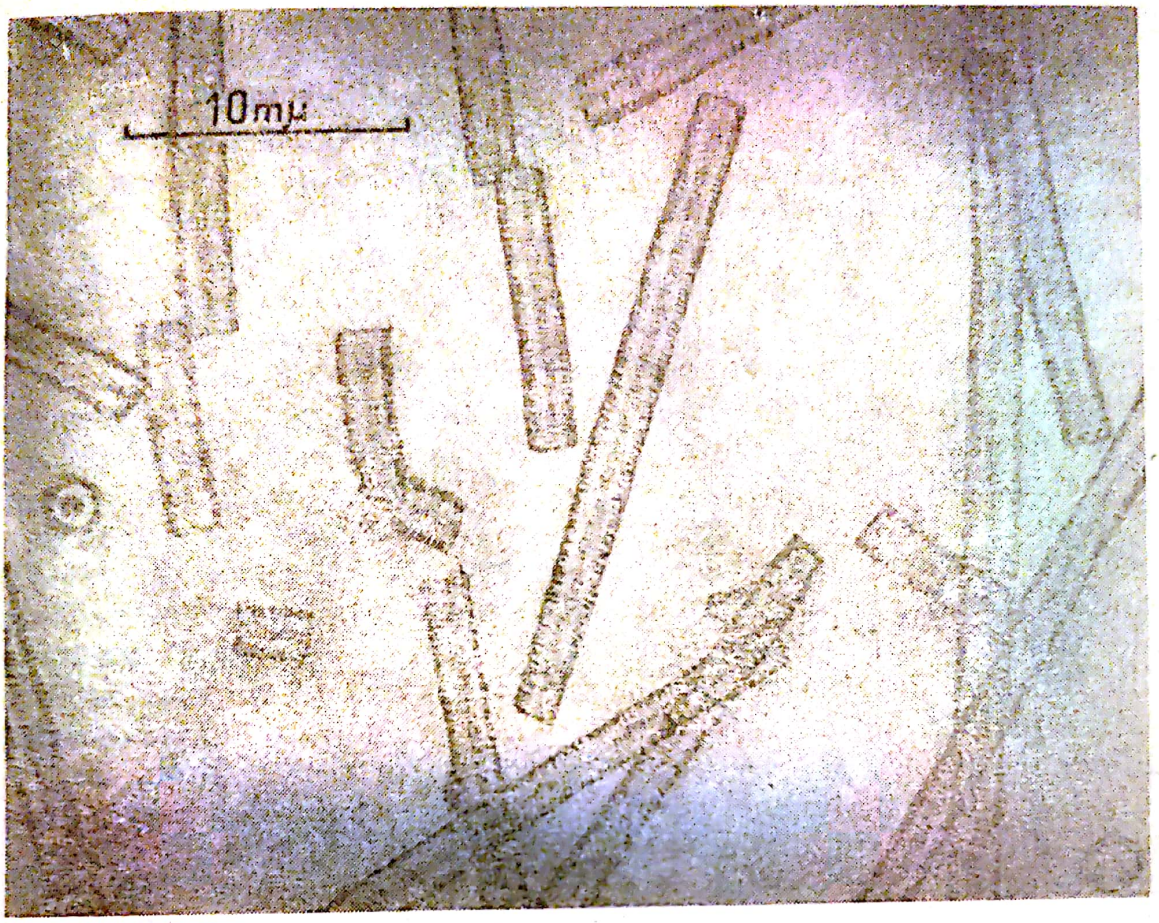


Fig. 4.3. Proteina VMT reagregată, evidențiată prin „contrast negativ" (vezi text) (după Nixon și Woods, 1960).

constituie un detaliu structural *din interiorul* fiecărei subunități. El nu trebuie confundat cu dispunerea spiralată cu mult mai amplă a subunităților din fig. 4.2, care reprezintă structura cuaternară a proteinei VMT (în sensul în care am definit acest termen în cap. 3). Acest fapt devine mai clar dacă se compară scările indicate pe fig. 4.2 și 3.8.

Helixul ne apare astăzi ca un element fundamental la diverse niveluri de organizare a structurii macromoleculare. În paragrafele următoare vom vedea că molecula de tropocolagen este alcătuită prin răsucirea împreună a 3 lanțuri peptidice și că, în cheratină și miozină, α—helixurile se răsucesc unele pe altele ca sforile într-o frînghie, formînd superspirale. Subunitățile de proteină se pot agrega în mod elicoidal, dînd naștere la tuburi,

Scanned with OKEN Scanner

goale pe dinăuntru (VMT), sau la fibre (actină). Lanţurile de acizi nucleici formează de asemenea spirale (cap. 9).

Crane şi alţii au discutat raţiunile teoretice şi formale care duc la predominanţa acestor forme elicoidale. Elementele esenţiale ale argumentaţiei lor pot fi ilustrate cel mai bine dacă ne întoarcem din nou la lanţul reprodus în fig. 3.7. Toate legăturile din acest lanţ sînt identice între ele, aşa încît el poate servi ca model pentru orice tip de lanţ molecular, cum este, spre exemplu, structura axială a lanţului peptidic, în care o aceeaşi grupare se repetă de multe ori. Dacă un lanţ de acest tip are tendinţa să se îndoaie sau să se încolăcească mai degrabă decît să rămînă într-o formă şerpuind la întîmplare şi mereu schimbătoare, aceasta se petrece ca rezultat al acţiunii forţelor de atracţie dintre unităţile ce se repetă în lanţul respectiv. Întrucît toate aceste unităţi sînt identice, lanţul va tinde să ia acea formă care să asigure raporturi spaţiale identice ale tuturor unităţilor cu unităţile vecine. În cazul lanţului din fig. 3.7, aceasta corespunde cu fixarea articulaţiilor mobile astfel încît unghiul format de planurile definite de legăturile adiacente (θ) să păstreze aceeaşi orientare în tot lungul lanţului. Dacă $\theta \neq 0$, lanţul va lua forma unei spirale. Spirala formată dintr-un singur lanţ sau din mai multe lanţuri împerecheate este deci o configuraţie favorabilă pentru orice structură în care se exercită o atracţie între unităţile ce se repetă —grupările din structura axială a lanţurilor peptidice, perechile de baze din structura acizilor nucleici. Din motive similare, spirala este o conformaţie adecvată şi în cazul agregării unor subunităţi proteice identice.

Deşi acizii nucleici şi interacţiunile lor cu proteinele nu vor fi discutate pînă la cap. 9, este totuşi indicat să amintim aici efectul pe care îl exercită lanţul de acid nucleic asupra asamblării subunităţilor de VMT. Structura tubulară formată prin reagregarea proteinei singure este mai puţin stabilă decît cea a virusului complet şi gradul de agregare este variabil. Prezenţa lanţului de acid nucleic pare să accentueze coeziunea dintre subunităţile aflate în turele succesive ale structurii cuaternare spiralate; de altfel, în structura nucleoproteinei (adică a virusului complet) gradul agregării este determinat de lungimea lanţului de acid nucleic, aşa încît particulele au o lungime uniformă de 300 mμ.

Scanned with OKEN Scanner

Într-o celulă infectată cu un virus virulent se sintetizează atît acidul nucleic, cît şi componenta proteică a noilor particule de virus; după un anumit interval se produce liza, însoţită de punerea în libertate, din celula dezintegrată, a unui mare număr de particule virale nou formate. În cursul sintezei VMT, subunităţile de proteină nou formate probabil că se agregă şi se desfac în mod continuu, cu sau fără încorporarea de lanţuri de acizi nucleici. Dar întrucît virusul complet este forma de agregare cea mai stabilă a acestor componente, se va produce o acumulare continuă de particule de virus complete, concomitent cu scăderea proporţiei de material asamblat în formele incomplete. Credem că acesta este modul în care legile termodinamicii, discutate în anexa 3, duc la formarea spontană a structurilor complexe în cursul infecţiei virale, ca şi în cel al sintezei normale a componentelor celulare. Probabil că aceleaşi principii au avut un rol important şi în evoluţia biomoleculară (anexa 6). Structurile care se formează şi persistă sînt acelea care au conformaţia cea mai stabilă, în care lanţurile moleculare şi subunităţile componente se găsesc într-o stare de energie potenţială termodinamică minimă.

COMPONENTA PROTEICĂ A VIRUSURILOR SFERICE MICI

Markham şi Smith au arătat în 1949 că un preparat de virus al mozaicului galben al napului (VMGN)* supus centrifugării se separă în două componente, una care se dispune pe fundul tubului, infecţioasă, şi o componentă de suprafaţă, neinfecţioasă. (Separarea din cursul centrifugării se realizează datorită prezenţei a două tipuri de particule, fenomen total diferit de cel al separării spontane a suspensiilor de VMT în două faze.) Atît particulele din componenta inferioară, de pe fundul tubului, cît şi cele din componenta de suprafaţă obţinute prin centrifugare pot fi cristalizate, iar spectrele de difracţie cu raze X date de aceste cristale arată că ambele tipuri de particule au, în linii mari, o formă sferică, cu un diametru de aproximativ 28 mμ. Asemănarea dintre cristalele formate de cele două tipuri de particule indică, de asemenea, faptul că cele două tipuri de particule prezintă trăsături structurale similare. Analiza chimică a arătat că com-

* In limba engleză: *turnip yellow mozaic virus* (TYMV). — *N. T.*

Scanned with OKEN Scanner

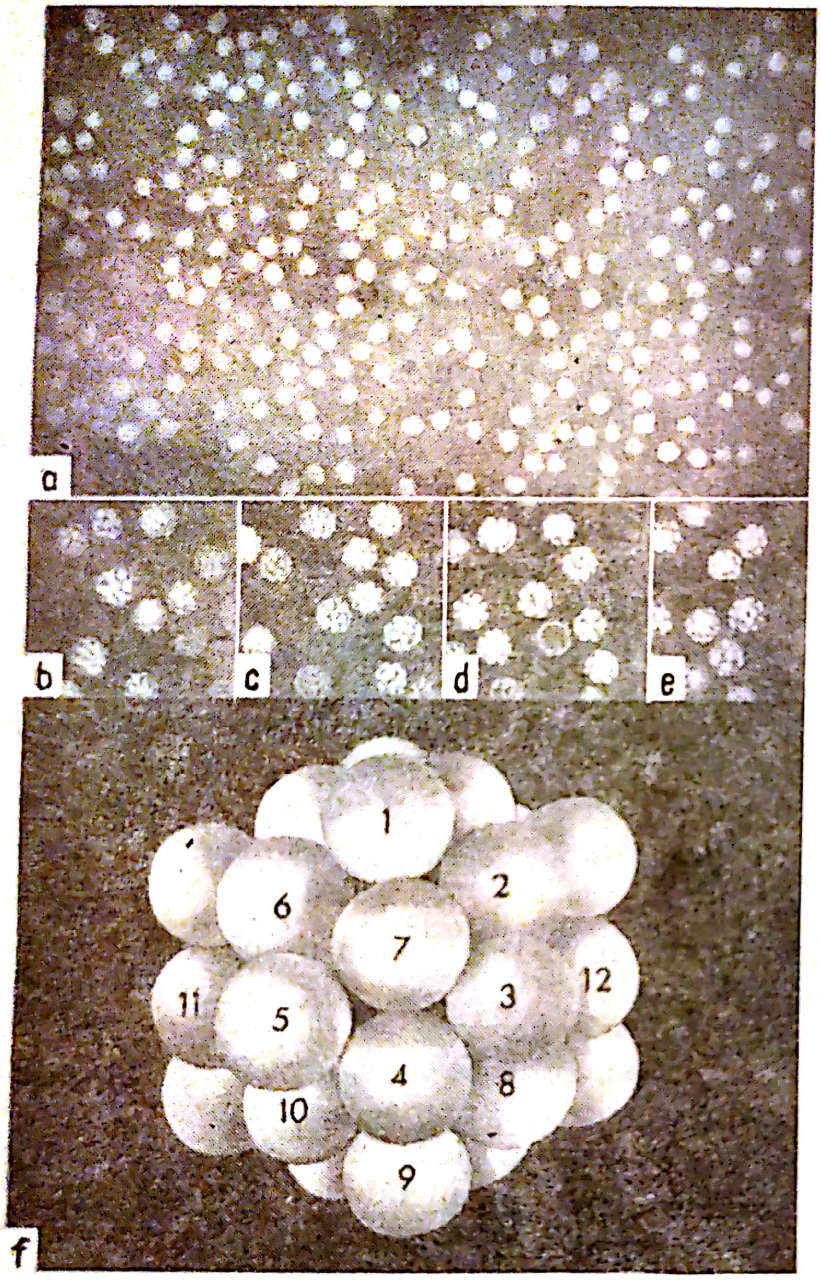


Fig. 4.4. Particule de virus al mozaicului galben al napului (VMGN), evidențiate prin „contrast negativ".

Inelele ce apar pe alocuri în imaginea (*a*) sînt învelișuri proteice goale; această imagine este reprodusă la mărire de 100 000 x. Cîmpurile (*b*), (*c*), (*d*) sînt zone din (*a*) mărite de două ori mai mult. La această mărire mai puternică se disting cu claritate detalii structurale ale particulelor de virus. Imaginea de jos (*f*) reprezintă un model al învelișului proteic al virusului (discutat în text), elaborat pe baza detaliilor ce se pot vedea în aceste imagini electronoptice. Diametrul particulei de virus este de 28—30 mμ, iar diametrul fiecăreia dintre cele 32 de capsomere din care este alcătuit învelișul proteic (capsida) este de 7—9 mμ (după Nixon și Gibbs, 1960).

ponenta de suprafață este de natură pur proteică, iar cea din profunzime este o nucleoproteină. S-a bănuit că această componentă de profunzime reprezintă particulele complete de virus, în care acidul nucleic este încorporat într-un înveliș sferic sau aproape sferic, în timp ce componenta de suprafață cuprinde învelișuri proteice goale, neinfecțioase. Acest punct de vedere a fost confirmat recent de imaginile electronoptice obținute prin metoda contrastului negativ (fig. 4.4). Este probabil că în celula

Scanned with OKEN Scanner

infectată se sintetizează, pe lîngă particule complete, într-o oarecare măsură şi învelişuri proteice goale. S-a arătat că şi la numeroase alte virusuri sferice mici acidul nucleic este înglobat în învelişuri proteice asemănătoare, denumite astăzi *capside*.

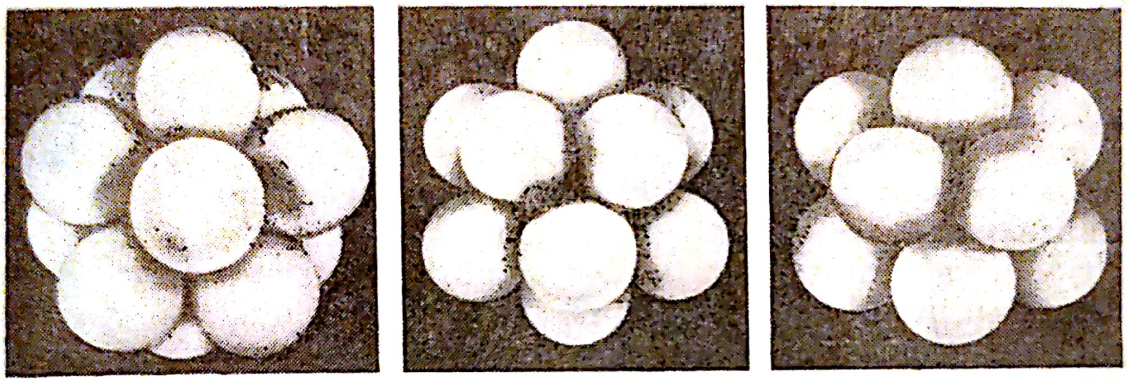
Cînd s-a descoperit că fracţiunea proteică a virusului tubular VMT este alcătuită dintr-un mare număr de subunităţi identice, dispuse în mod regulat, Watson şi Crick au emis ipoteza că un principiu similar ar putea sta şi la baza structurii capsidei virusurilor sferice mici. A fost necesar ca acest concept să fie lărgit într-o oarecare măsură, întrucît unele capside par să conţină nu un singur, ci mai multe tipuri de unităţi structurale. Vom începe totuşi prin a discuta care sînt construcţiile sferice sau aproape sferice care pot fi formate din subunităţi de un singur tip, fiecare dintre ele fiind încorporate în structura respectivă într-un mod identic. De fapt, aceasta reprezintă o problemă simplă de geometrie a solidelor. În vederea scopului urmărit, ne vom concentra atenţia asupra a două tipuri de soluţii : anumite construcţii cu simetrie cvadruplă şi anumite construcţii cu simetrie cvintuplă. Semnificaţia acestor clasificări ale tipurilor de simetrie poate fi descrisă cel mai bine o dată cu cea a structurii propriu-zise a acestor două tipuri de construcţii.

Spre exemplu, capsida virusului ØX174 care infectează bacteriile *Escherichia coli* (şi care deci face parte dintre bacteriofagi) este considerată, pe baza aspectului pe care îl prezintă în microelectronografii, a fi alcătuită din 12 subunităţi identice aranjate ca în modelul reprodus în fig. 4.5. În funcţie de axele în lungul cărora este privit acest model, se observă că în unele are o simetrie cvintuplă (fig. 4.5*A*), în altele o simetrie triplă (fig. 4.5*B*) şi, în sfîrşit, în altele — dublă (fig. 4.5*C*). Nu ştim dacă unităţile structurale ce se observă pe microelectronografiile obţinute prin contrast negativ corespund subunităţilor de proteină (aşa cum le-am definit în cap. 3). După cum vom vedea, pentru unele virusuri avem, dimpotrivă, dovezi că realitatea este alta : unitatea structurală ne apare ca fiind alcătuită din mai multe subunităţi chimice. Unităţile ce alcătuiesc capsida şi care se observă pe microelectronografiile ce redau structura virală au primit de aceea denumirea specială de *capsomere*.

Pentru ca simetria completă a unei asemenea construcţii să fie de tip 5—3—2, trebuie ca rotirea cu 360°/5 = 72° în jurul axelor cvintuple, cu 360°/3 = 120° în jurul axelor triple şi cu

Scanned with OKEN Scanner

360°/2 = 180° în jurul axelor duble să ducă fiecare la o structură absolut identică. Modelul din fig. 4.5, alcătuit din mingi de tenis de masă, are o simetrie completă de tip 5.3.2, întrucît mingea centrală din fig. 4.5*A* este o sferă perfectă şi, dacă ne luăm privirea de la model şi apoi îl privim din nou nu putem spune dacă între timp el nu a fost cumva rotit cu 72°. Dacă însă



A *B* *C*

Fig. 4.5. Model propus pentru bacteriofagul ØX174, construit din 12 mingi de tenis de masă.

Modelul a fost fotografiat în lungul uneia dintre axele sale de simetrie cvintuplă (*A*), al uneia dintre axele triple (*B*) şi al uneia dintre axele duble (*C*).

pe o microelectronografie observăm un asemenea tip de simetrie la capsida unui virus, s-ar putea ca ea să nu aibă o simetrie 5.3.2 adevărată, deoarece chiar dacă această capsidă ar fi orientată ca în fig. 4.5*A* şi am putea creşte puterea separatoare pentru a observa detaliile lanţurilor polipeptidice încolăcite din capsomerul central s-ar putea să constatăm că am putea detecta o asemenea rotaţie cu 72°. Pentru ca simetria cvintuplă să se extindă pînă la nivel molecular, fiecare capsomer din această construcţie ar trebui să aibă o simetrie cvintuplă şi deci capsida ar trebui să fie alcătuită din 60 de subunităţi sau dintr-un multiplu al acestui număr. Datele de ordin chimic (tabelul 9.3) sugerează că, într-adevăr, capsida bacteriofagului ØX174 este alcătuită din 60 de subunităţi identice, avînd fiecare o greutate moleculară ~ 70 000. Capsomerele, reprezentate în fig. 4.5 prin mingi de tenis de masă, sînt astfel probabil agregate cuprinzînd cîte 5 subunităţi, fiecare dintre acestea fiind tot atît de mare şi de complexă ca molecula de hemoglobină. Diametrul virusului ØX174 este de aproximativ 25 mμ.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a avea o simetrie completă de tip 4.3.2, un înveliș sferic de acest fel ar trebui să conțină 24 sau un multiplu de 24 de subunități identice (fig. 4.6). S-a crezut într-un timp că proteina de depozitare a fierului, apoferitina, care are un diametru de ~ 12 mμ, este o structură de acest tip, dar astăzi pare mai probabil că această moleculă conține 20 de subunități.

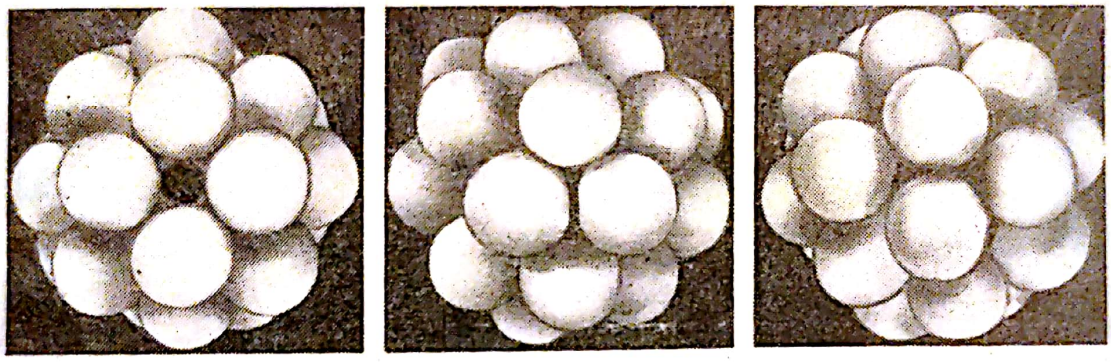


Fig. 4.6. Model construit din 24 de mingi de tenis de masă, care ilustrează simetria 4—3—2.

Modelul a fost fotografiat de-a lungul uneia dintre axele sale cvadruple (*A*), a uneia dintre axele triple (*B*) și al uneia dintre axele duble (*C*).

Este destul de curios faptul că toate particulele de virusuri mici care au fost studiate atît cu ajutorul difracției cu raze X, cît și prin microscopie electronică s-au dovedit a avea o simetrie de tip 5.3.2, și nu de tip 4.3.2. Capsida VMGN (fig. 4.4), deși doar cu puțin mai mare decît cea a bacteriofagului ØX174, prezintă o structură mai complicată decît cele discutate pînă acum, în sensul că ea conține în total 32 de capsomere care par a fi de două tipuri: 12 cu o simetrie ca a celor din structura fagului ØX174 și 20 de capsomere de un tip deosebit. Fiecare dintre primele 12 capsomere vine în contact, în cadrul capsidei, cu cîte alte 5 capsomere (de exemplu, cazul capsomerelor numerotate cu nr. 1, 3, 5, 9 în modelul din fig. 4.4), în timp ce fiecare dintre celelalte 20 de capsomere are 6 vecini (de exemplu, capsomerele numerotate cu nr. 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 din fig. 4.4). Datele existente pînă la ora actuală asupra dimensiunilor subunităților chimice din VMGN sînt contradictorii (tabelul 9.3). S-ar părea că diferitele tipuri de capsomere conțin subunități chimice diferite, după cum este posibil să existe un singur tip de subunitate

Scanned with OKEN Scanner

care să prezinte o maleabilitate suficientă în dispunerea grupărilor de la suprafaţa ei pentru a permite asamblarea în agregate de cîte cinci (în capsomerele cu cinci vecini) sau de cîte şase (în

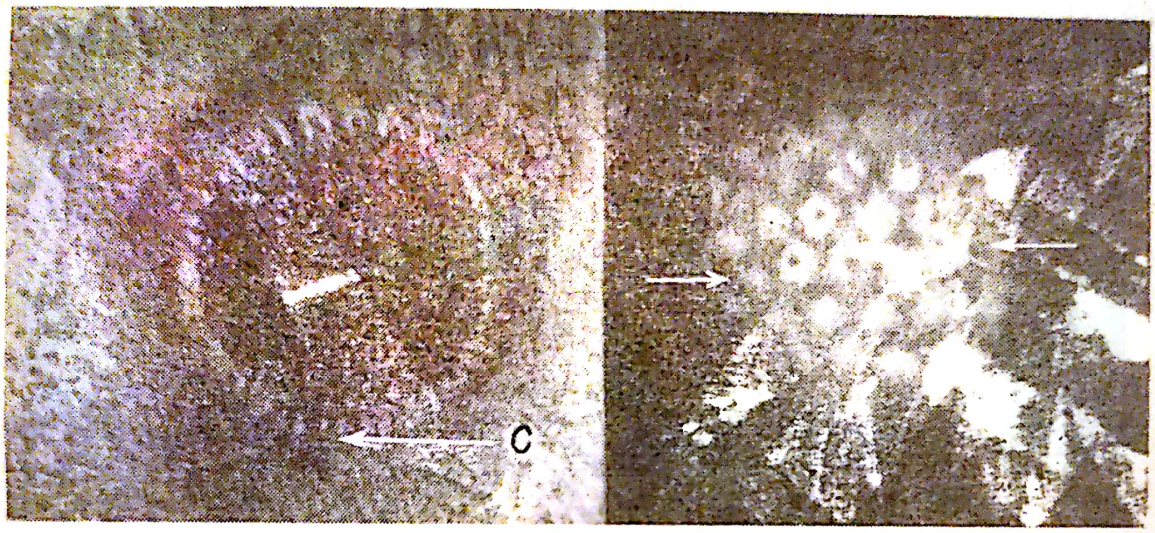


Fig. 4.7. Imagini ale virusului *Herpes simplex* în contrast negativ.

Capsomerele acestui virus, însemnate în figură cu litera *C*, apar sub forma unor scurte formaţii tubulare, cu o lungime de 13 mμ şi cu un diametru de 10 mμ. Întreaga capsidă are un diametru de aproximativ 100 mμ (deci de peste 3 ori mai mare decît cel al capsidei VMGN) şi este alcătuită din 162 de capsomere. Virusul polioma este de un tip asemănător, deşi ceva mai mic, avînd un diametru de 45 mμ şi 42 de capsomere tubulare scurte (după Wildy, Russel şi Horne, 1960).

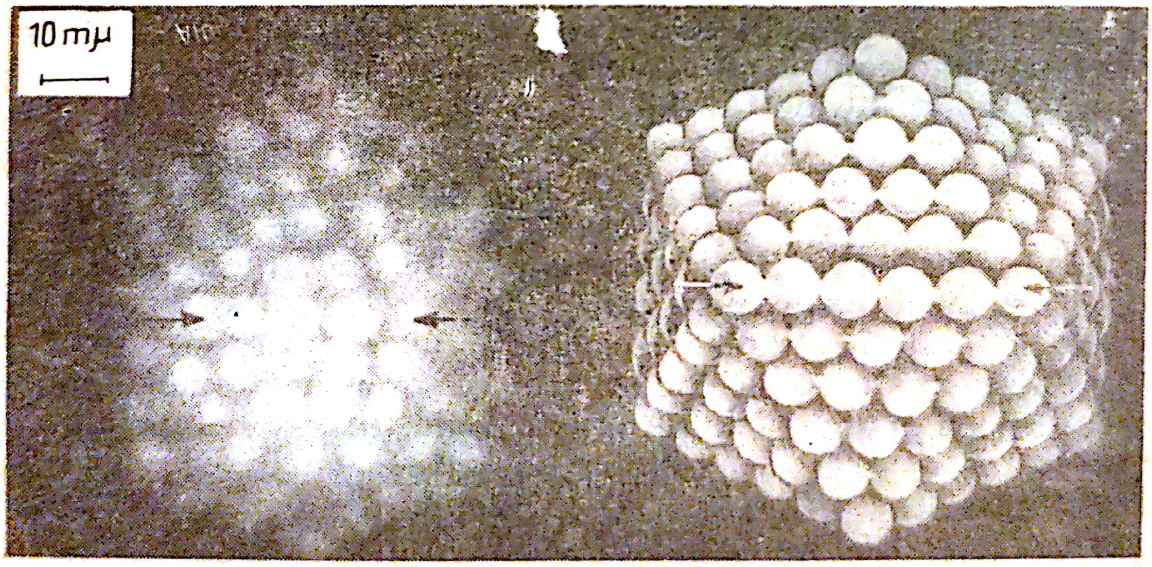


Fig. 4.8. Imagine în contrast negativ a adenovirusului de tip 5, precum şi interpretarea ei sub forma unui înveliş icosaderal cu 252 de capsomere (după Horne şi colab., 1959).

Scanned with OKEN Scanner

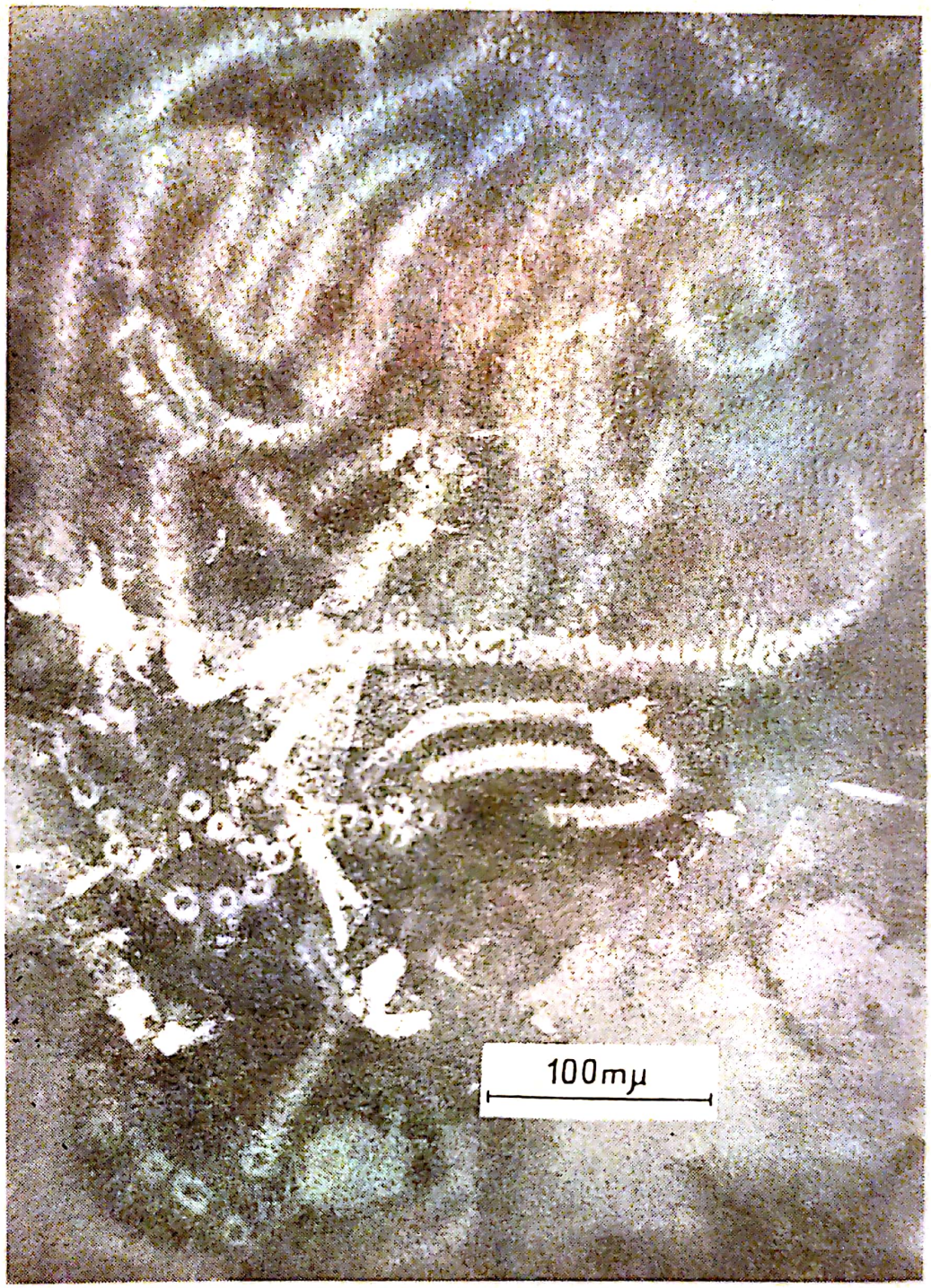


Fig. 4.9. Imagine în contrast negativ a unei particule de virus al parotiditei epidemice ce a suferit o disrupere parțială.

Aceste virusuri mari au dimensiuni variabile (diametru de la 100 la 600 mμ). În interiorul unei membrane apar structuri elicoidale goale pe dinăuntru, încolăcite ca niște variante mai flexibile ale helixului VMT. Membrana prezintă, pe suprafața sa externă, o palisadă de țepi proeminenți, lungi de aproximativ 9 mμ fiecare, dispuși la distanțe de 7—8 mμ unul de altul. Virusul gripal are o structură asemănătoare, dar este ceva mai mic, diametrul său variind în jurul valorii de 100 mμ (după Horne și Waterson, 1960).

Scanned with OKEN Scanner

capsomerele cu şase vecini). Dacă această flexibilitate de dispunere este într-adevăr o realitate frecventă a structurii capsidei, aceasta ar explica predominanţa simetriei cvintuple.

Se consideră că virusul poliomielitic are o structură întrucîtva asemănătoare cu a VMGN. Virusul polioma, care provoacă tumori la diferite animale, precum şi *Herpes simplex*, care determină leziuni ale buzelor la om, sînt construite după o schemă similară (fig. 4.7), dar au un număr mai mare de capsomere decît VMGN. Capsomerele acestor virusuri apar sub forma unor tuburi goale pe dinăuntru şi, ca atare, este aproape sigur că ele sînt alcătuite din subunităţi. La adenovirusul de tip 5, răspunzător de anumite infecţii ale faringelui (fig. 4.8), capsida este un înveliş poliedric cu un diametru de 70 mμ, cu 20 de feţe, formată din 252 de capsomere.

În structura globală a virusului herpetic, componenta nucleoproteinică poliedrică este înglobată într-o membrană slab aderentă de ea, care este probabil desprinsă din membrana celulară în momentul în care virusul nou format părăseşte celula infectată. La alte virusuri mai mari, cum ar fi cel al parotiditei epidemice şi cel gripal, nucleoproteina pare să se dispună sub forma unor spirale lungi — poate variante mai flexibile ale helixului VMT —, încolăcite în interiorul unei membrane (fig. 4.9).

BACTERIOFAGUL T_2

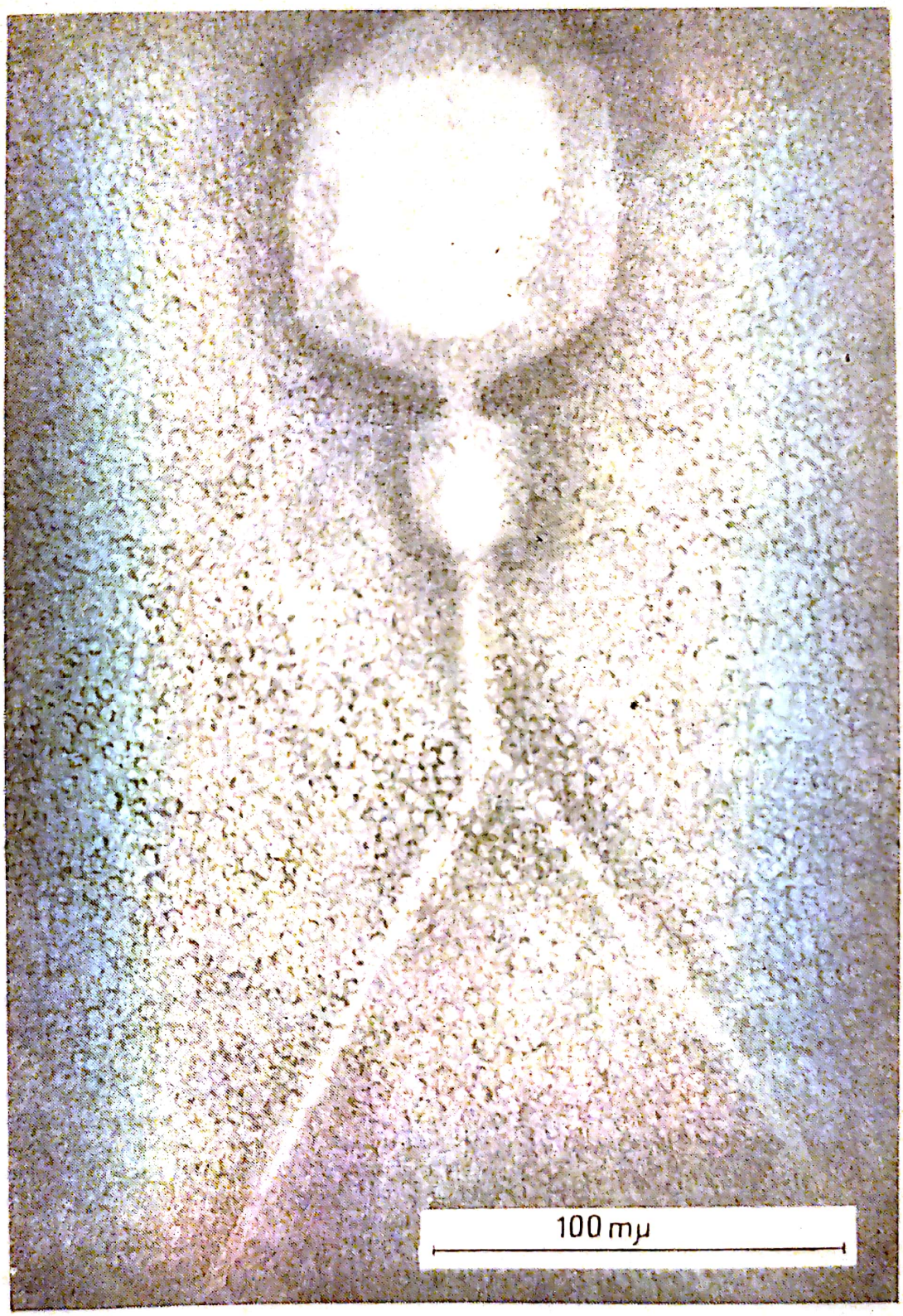
Structura bacteriofagului T_2 prezintă un oarecare interes, fiind o variantă a construcţiilor discutate pînă acum. Acest microorganism, precum şi bacteriofagul T_4, foarte asemănător, au fost folosite în cercetările moderne de genetică (cap. 10), în studierea interacţiunii dintre acidul nucleic fagic şi cel al cromozomului (cap. 8) şi în cercetarea formării „ARN mesager" (cap. 12). Atît structura bacteriofagului T_2, cît şi raporturile

---

Fig. 4.10. Imagine în contrast negativ a bacteriofagului T_2.

În particula din acest preparat s-a produs contracţia învelişului extern al cozii, dînd naştere gulerului care se vede în apropierea capului bacteriofagului. În imaginile în contrast negativ ale unor cozi de bacteriofagi izolate se observă că porţiunea centrală necontractilă este un tub, gol pe dinăuntru, iar la capătul distal al cozii se poate distinge o placă hexagonală de care sînt legate şase filamente. Două asemenea filamente sînt net vizibile în imagine (după Brenner şi colab., 1959).

Scanned with OKEN Scanner



Scanned with OKEN Scanner

dintre structura acestuia şi procesul de infecţie a bacteriilor justifică discutarea lor într-un paragraf special.

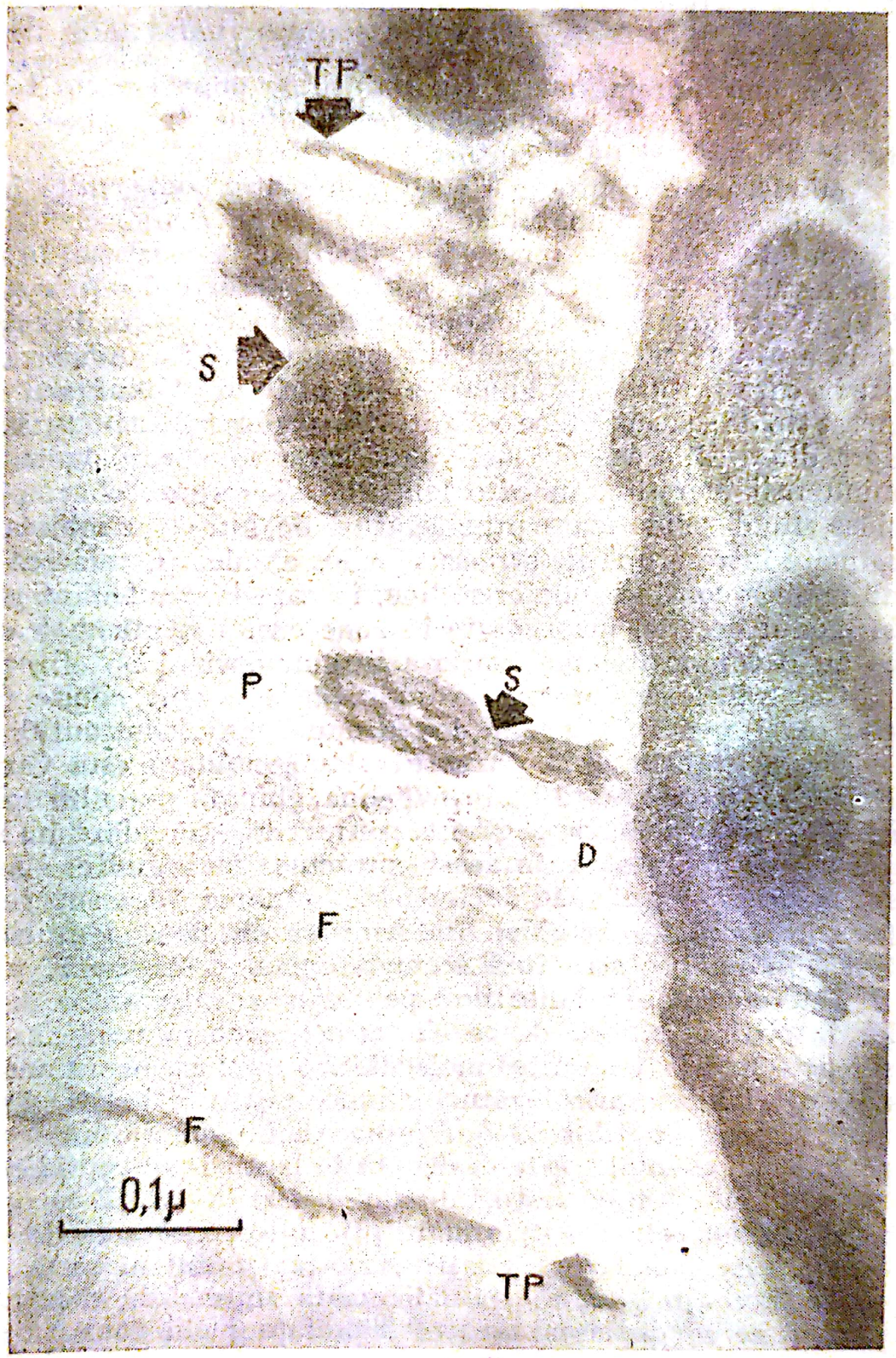
„Capul" bacteriofagului T_2 are o mărime asemănătoare cu a adenovirusului amintit în paragraful anterior (adică un diametru de aproximativ 70 mμ). El constă dintr-un înveliş proteic ce conţine în interiorul său acidul nucleic sub forma unei duble spirale lungi de ADN cu o greutate moleculară de $\sim 120 \times 10^6$ (cap. 8 şi 9), îndoită în zigzag sau încolăcită în interiorul învelişului de proteină. Pe microelectronografii, capul se prezintă sub forma unui hexagon uşor alungit (fig. 4.10), al cărui înveliş proteic se poate presupune că este alcătuit din capsomere dispuse în mod regulat, ca şi cele ale adenovirusului.

Legată de cap se găseşte o „coadă", ce are forma unui tub de proteină gol pe dinăuntru; la capătul acestui tub se găsesc fixate nişte fibrile proteice subţiri (fig. 4.10). Particulele fagice se fixează pe bacteriile *E. coli* datorită interacţiunii specifice dintre proteina fibrilelor şi anumite zone de pe peretele celulei bacteriene. Această legare este urmată de contractarea unei părţi din proteinele ce alcătuiesc coada tubulară, însoţită de punerea în libertate de ADP care pînă atunci era legat de proteinele cozii (sub formă de ATP). Această scindare a ATP furnizează probabil energia necesară procesului de contracţie, care este însoţit sau urmat imediat de injectarea în citoplasma bacteriană — prin coada tubulară, peretele bacterian şi membrana citoplasmatică — a acidului nucleic conţinut în capul bacteriofagului. În fig. 4.11 se poate observa un bacteriofag „consumat", al cărui înveliş proteic golit şi colabat mai este încă legat de peretele bacterian prin fibrilele cozii sale.

Fig. 4.11 Infectarea unei bacterii *E. coli* de către bacteriofagul T_2, evidenţiată pe o secţiune ultrafină (fixare cu tetraoxid de osm și incluzionare în metacrilat, tehnici descrise în cap. 5).

O particulă fagică (*P*), fixată de peretele bacterian prin vîrful cozii (filamentele cozii), şi-a descărcat conţinutul capului în citoplasma bacteriană. Comparat cu particula care se găseşte imediat deasupra ei în imagine, capul fagului fixat de peretele bacterian apare golit şi colabat. Comparativ cu teaca cozii particulei din fig. 4.10, cea a particulei pe peretele bacteriei apare contractată, deşi poate incomplet. În citoplasma bacteriei infectate se pot observa capete de bacteriofagi nou sintetizaţi. (*TP* — fragmente de coz rupte în cursul manoperelor de preparare; *S* — porţiunea subţire a cozii, din apropierea capului -a se compara cu fig. 4.10; *D* — locul de fixare a fagului de peretele bacteriei; *F* — filamentele cozii sau molecule de ADN puse în libertate în cursul manoperelor de preparare (după Mercer, 1959).

Scanned with OKEN Scanner



Scanned with OKEN Scanner

Ne vom îndrepta acum atenţia asupra unor aspecte total diferite ale structurii proteinelor, ocupîndu-ne de mătase, o proteină fibroasă, şi de cheratine.

Mătasea este o proteină cu o compoziţie neobişnuită în aminoacizi. Aproape jumătate din resturile de aminoacizi sînt reprezentate de glicină, iar ceea ce rămîne este constituit în special din resturile celorlalţi aminoacizi mici, alanina şi serina (tabelul 3.2). Cercetarea peptidelor obţinute din mătase prin digestie parţială a arătat că principalul tip de secvenţă de aminoacizi este cel în care resturile de glicină alternează cu alanină sau serină. Acest tip de secvenţă face ca lanţurile să adopte o structură secundară diferită de cea a α-helixului. Ele se grupează laolaltă formînd fîşii încreţite, în care lanţurile sînt aproape complet întinse, fiind solidarizate prin legături de hidrogen intercatenare formate între grupările structurilor lor axiale. Se crede că un fir de mătase conţine zone cristaline, în care lanţurile sînt grupate în modul descris, încorporate în zone cu structura mai amorfă, ce au o compoziţie mai variată în aminoacizi.

Cheratinele sînt proteinele din lînă, păr, coarne, copite, unghii, gheare şi pene. Trăsătura lor comună este conţinutul bogat în cistină (tabelul 3.2). Structura lor secundară este variabilă. Există date care arată că în păr, lînă, ghimpii porcului spinos şi în alte cîteva cheratine se găseşte o structură secundară în α-helix şi s-a emis ipoteza că, în aceste proteine, mai multe α-helixuri se răsucesc împreună ducînd la formarea de super-spirale (ca sforile dintr-o frînghie). În cheratina din pene, lanţurile peptidice îmbracă o structură secundară mai desfăşurată.

Interconectarea lanţurilor peptidice ca urmare a bogăţiei lor în cistină explică de ce cheratinele sînt proteine insolubile şi foarte stabile. Greutatea moleculară a unui asemenea ansamblu de lanţuri legate prin legături chimice poate fi foarte mare, dar după ruperea punţilor S—S, o proporţie însemnată din cheratina penelor, de exemplu, este desfăcută în lanţuri polipeptidice alcătuite din cîte 100 de resturi de aminoacizi fiecare. Este probabil că şi alte cheratine sînt formate prin interconectarea de lanţuri cu greutate moleculară relativ scăzută. Modul în care celulele epidermice ajung să se specializeze în sinteza de cheratine pe măsură ce se deplasează către suprafaţa pielii constituie unul

Scanned with OKEN Scanner

din aspectele problemei generale a controlului sintezei proteice în cursul diferenţierii celulare, ce va fi discutată în capitolele următoare.

COLAGENUL ŞI DEPUNEREA DE SUBSTANŢĂ OSOASĂ

Colagenul este o altă proteină a cărei compoziţie neobişnuită în aminoacizi duce la un tip deosebit de structură secundară şi la formarea de fibre proteinice cu proprietăţi speciale. În ţesutul conjunctiv, în tendoane şi cartilaje, aceste proprietăţi au în primul rînd un rol de structură, dar în depunerea de substanţă osoasă fibrele de colagen mai au în plus rolul de a constitui centri de condensare pentru creşterea cristalelor aciculare de hidroxiapatită [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$]. O treime din resturile de aminoacizi ale colagenului sînt constituite de glicină şi circa un sfert din prolină sau din aminoacidul foarte înrudit hidroxiprolina, care nu se întîlneşte decît în colagen (tabelul 3.2).

Resturile de prolină şi hidroxiprolină nu pot fi încorporate într-un α-helix, deoarece nu au o grupare N-H (tabelul 3.1) şi catenele lor laterale împiedică apropierea strînsă dintre o grupare C = O şi azotul structurii axiale, ceea ce constituie una din trăsăturile α-helixului. În general, proteinele cu o proporţie mică de lanţuri polipeptidice dispuse în formă spiralată (tabelul 3.3) sînt tocmai acele proteine care au un conţinut bogat în prolină. În colagen, al cărui conţinut în prolină şi hidroxiprolină se ridică la 25%, lanţurile nu formează α-helixuri; cercetările de difracţie cu raze X au arătat că, în schimb, se produce răsucirea împreună a cîte trei lanţuri, ceea ce duce la structura reprezentată în fig. 4.12. Fiecare al treilea rest de aminoacid din aceste lanţuri este constituit din glicină, grupările lor N-H servind la formarea unor legături de hidrogen intercatenare. Moleculele de colagen au o greutate moleculară de ~360 000, fiecare lanţ polipeptidic avînd o greutate moleculară de ~120 000 şi conţinînd aproximativ 1 000 de resturi de aminoacizi. Răsucirea împreună a trei asemenea lanţuri duce la formarea unei molecule lungi de 280 mμ şi cu un diametru de 1,4 mμ.

Moleculele izolate de colagen aflate în această formă (cu greutate moleculară de cca. 360 000) au fost denumite „tropo-

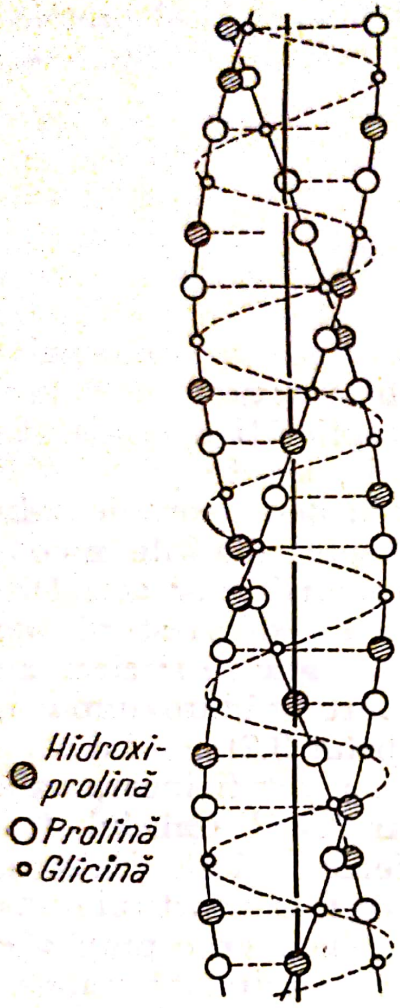


Fig. 4.12. Reprezentare schematică a răsucirii laolaltă, în formă elicoidală, a trei lanțuri peptidice desfășurate din structura colagenului (după Rich, reprodus de Schmitt, 1959).

colagen", iar tipul de grupare caracteristic fibrelor de colagen nativ, observat pe microelectronografii, a fost interpretat în sensul unei structuri în care moleculele de tropocolagen se alătură cap la cap și unele lîngă altele, moleculele paralele vecine depășindu-se cu cîte un sfert din lungimea lor (fig. 4.13). În condițiile de experimentare *in vitro*, moleculele de tropocolagen se pot agrega, de asemenea, însă în fibre cu o structură mai neregulată sau diferit orientată, structură ce depinde, spre exemplu, de concentrația salină existentă în mediu în timpul agregării.

În oase, într-o matrice de fibre de colagen se găsesc implîntate cristale mici, aciculare de hidroxiapatită, lungi de 20—40 mμ și cu un diametru de 1,5—3 mμ. Cercetarea cu ajutorul microscopului electronic a etapelor precoce ale calcificării a

Scanned with OKEN Scanner

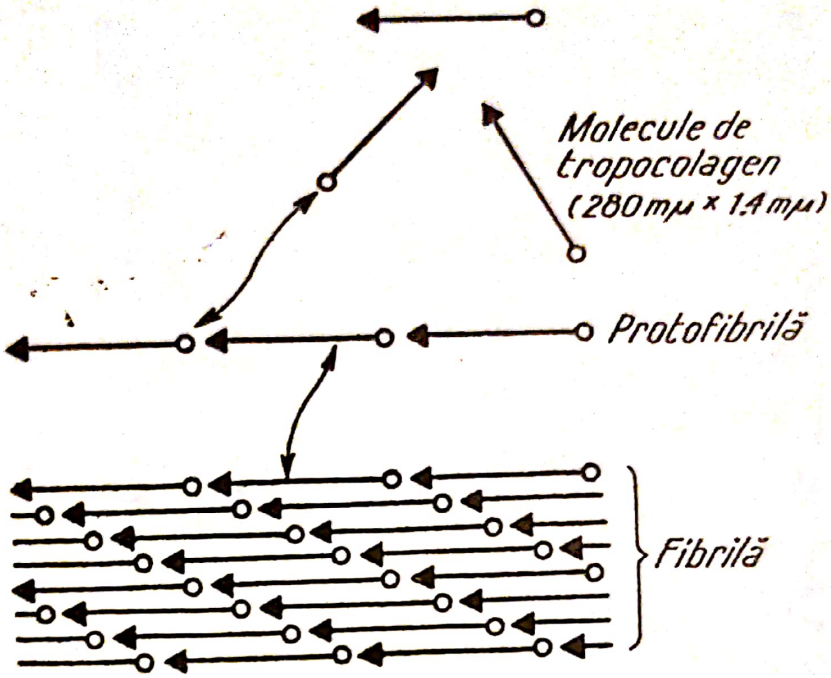


Fig. 4.13. Reprezentare schematică a modului în care se asamblează moleculele de tropocolagen pentru a da naştere fibrelor de colagen (după Glimcher, 1959).

arătat că aceste cristale de apatită încep să se formeze la intervale regulate de-a lungul fibrelor (fig. 4.14), la nivelul anumitor locuri specifice din structura colagenului. Recent a devenit posibilă cercetarea mai aprofundată a acestui proces *in vitro*, prin „însămînţarea" unor soluţii aproape saturate de fosfat de calciu cu fibre de colagen. Studiile de difracţie cu raze X arată că cristalele de apatită formate în felul acesta sînt identice cu cele formate *in vivo*. Din aceste cercetări rezultă că se poate obţine acelaşi rezultat dacă soluţiile de fosfat de calciu sînt însămînţate cu fibre de colagen care au fost mai întîi desfăcute pînă la molecule de tropocolagen şi apoi reasamblate *in vitro*. Ele acţionează însă ca puncte de condensare numai dacă moleculele de tropocolagen s-au reagregat în forma iniţială a colagenului. Celelalte feluri de agregate, mai neregulate sau cu o orientare diferită, care se pot obţine uneori din tropocolagen *in vitro*, par să nu permită o conformaţie corectă a zonelor de pe suprafaţa lor, necesare pentru formarea de apatită.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 4.14. Imagine electronoptică a unei secțiuni ultrafine de os embrionar de pasăre, într-o perioadă precoce a osificării.

Se observă formarea unor depozite dense de apatită la nivelul unor sedii specifice de-a lungul fibrei de colagen (după Fitton-Jackson, 1957).

Scanned with OKEN Scanner

Fibrinogenul este o proteină cu o greutate moleculară de ~ 330 000 ce se găseşte în sîngele circulant, reprezentînd, la om, cca. 4% din proteinele plasmei. Pe baza datelor de ordin chimic se consideră că molecula de fibrinogen este alcătuită din două subunităţi identice, avînd fiecare o greutate moleculară de ~ 160 000 şi conţinînd cîte trei lanţuri peptidice separate. La microscopul electronic, această simetrie binară nu este evidentă, deoarece fibrinogenul apare ca o moleculă alungită de 28 mμ × × 6 mμ, alcătuită din trei unităţi globulare. Dimensiunile arătate sînt cele ale moleculei la un *p*H ~7. La punctul său izoelectric, la *p*H 5,5, molecula este ceva mai scurtă, iar în soluţii mai acide sau în cele alcaline, pe măsură ce dobîndeşte sarcini electrice libere, molecula se alungeşte. În timpul coagulării sîngelui, fibrinogenul este transformat în fibrină sub acţiunea unei enzime, trombina. În decursul acestei transformări are loc desprinderea de pe moleculă a patru peptide (fig. 4.15), două de tip *A* (cu cîte 19 resturi de aminoacizi fiecare) şi două de tip *B* (cu 21 de resturi fiecare). Moleculele modificate (fibrina) suferă apoi o agregare prin alăturare laterală şi cap la cap, dînd naştere fibrelor din cheagul de sînge.

În cele patru peptide, grupările acide precumpănesc asupra celor bazice, ceea ce face ca la *p*H ~7 peptidele să aibă o încărcătură liberă negativă. Proteina modificată va avea deci o încărcătură liberă diferită iar distribuţia sarcinilor superficiale va fi modificată. Totodată, la suprafaţa ei vor apărea noi zone, descoperite prin îndepărtarea peptidelor sau apărute ca urmare a unor modificări ale structurii terţiare consecutive acestei îndepărtări. Aceste modificări ale structurii moleculelor şi ale distribuţiei sarcinilor de pe suprafaţa lor trebuie să ducă într-un fel sau altul la o inversare a vechii precumpăniri a forţelor de respingere intermoleculară asupra forţelor de atracţie. Îndepărtarea numai a peptidelor *A* (de la capetele moleculelor) favorizează asamblarea cap la cap, în timp ce îndepărtarea peptidelor *B* (de la mijlocul moleculelor) favorizează agregarea laterală.

Enzimele peptice — pepsina, tripsina şi chimotripsina — se formează din pepsinogen, tripsinogen şi chimotripsinogen la fel cu formarea fibrinei din fibrinogen, prin hidroliza unor legături peptidice (fig. 4.16). Aceasta însă nu duce în toate cazurile

Scanned with OKEN Scanner

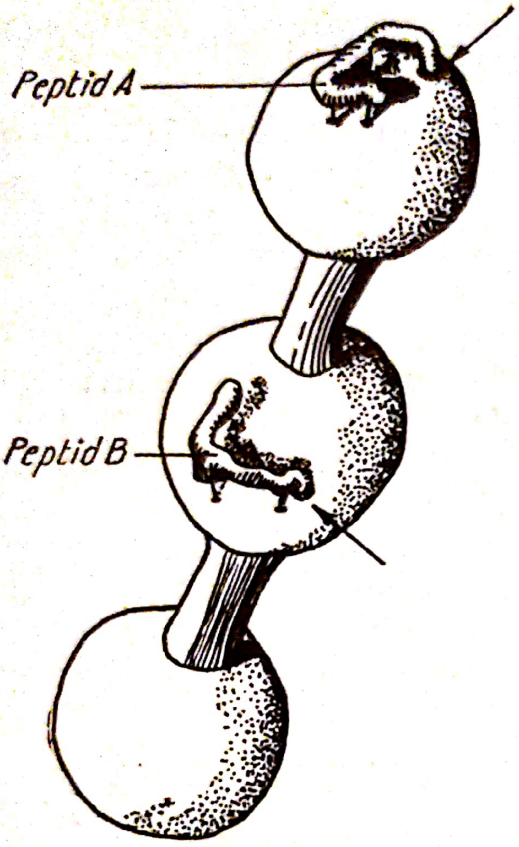


Fig. 4.15. Reprezentare schematică a „semimoleculei" de fibrinogen (greutate moleculară ~ 160 000).

Săgeţile indică locurile asupra cărora acţionează trombina. Cuişoarele scurte reprezintă legături de hidrogen şi alte legături fizice ce menţin peptidele cu conformaţia lor normală la suprafaţa moleculei, înaintea intervenţiei trombinei (după Laki, Gladner şi Folk, 1960).

la desprinderea unui peptid de pe molecula precursoare; fragmentul peptidic respectiv poate rămîne fixat de molecula de proteină. Hidrolizarea legăturii peptidice duce totuşi la o remaniere a structurii terţiare sau secundare ce are ca urmare descoperirea sau formarea zonei active.

Din acest punct de vedere prezintă interes faptul că subtilizina poate produce îndepărtarea de pe molecula de ribonuclează a unui peptid mic din douăzeci de aminoacizi. Mai precis, subtilizina hidrolizează legătura peptidică corespunzătoare iar tratarea ulterioară cu acid tricloracetic determină separarea peptidului. În acest caz, îndepărtarea peptidului are ca urmare inactivarea enzimei. Dacă se amestecă acest peptid cu enzima inactivată se ajunge la formarea unui agregat al acestor două elemente care este suficient de asemănător cu proteina originală pentru a prezenta o activitate enzimatică normală. Este posibil ca hormonii peptidici ai hipofizei — ocitocina, vatopresina, ACTH etc. (fig. 3.3) să acţioneze asupra ţesuturilor ce constituie ţinta efectului lor prin formarea unui complex cu o proteină pînă atunci inactivă, care are ca urmare producerea unei enzime active.

Scanned with OKEN Scanner

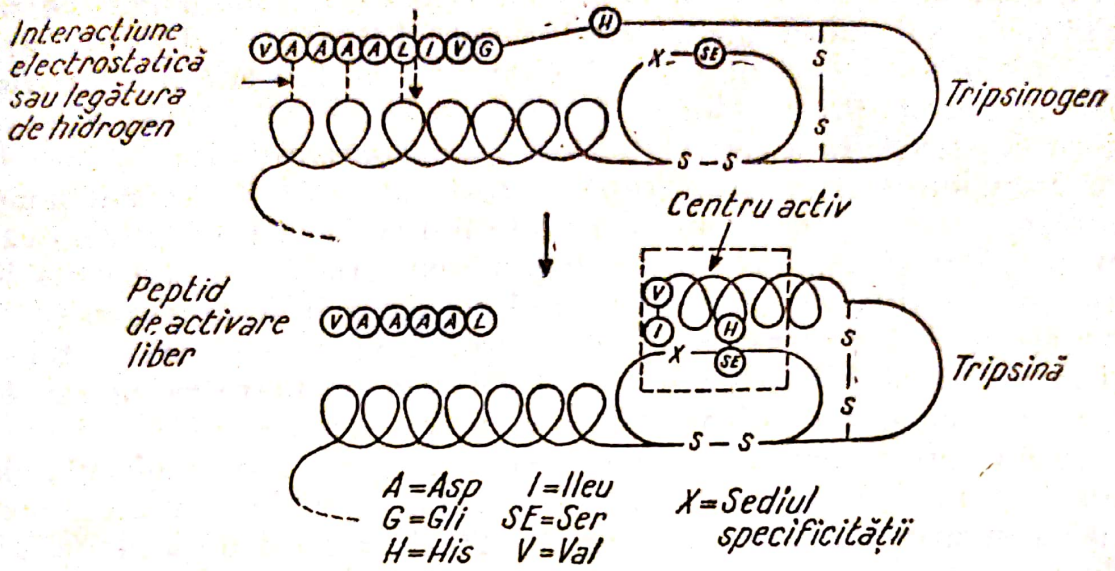


Fig. 4.16. Reprezentare schematică a convertirii tripsinogenului în tripsină. În acest proces de activare are loc separarea de molecula de tripsinogen a unui peptid conținînd 6 resturi de aminoacizi, proces ce are loc ca urmare a hidrolizării unei legături peptidice sensibile. Activarea tripsinei este o „reacție în lanț": produsul reacției (tripsina) catalizează activarea altor molecule.

MECANISMUL ACȚIUNII ENZIMELOR

După cum s-a arătat în cap. 2, activitatea enzimatică presupune formarea unui complex tranzitoriu între o moleculă proteică (enzima) și molecula (sau moleculele) de substrat ce iau parte la reacția catalizată. În cadrul acestui complex, moleculele de substrat sînt legate de o porțiune redusă a suprafeței enzimei, denumită *zona activă*. Pentru a înțelege mecanismul acțiunii enzimelor, este necesar să răspundem la două întrebări esențiale. Prima este problema specificității: cum se face că o enzimă dată nu formează complexe decît cu o categorie restrînsă de molecule de substrat? A doua este problema amănuntelor exacte ale procesului catalitic: cum reușește interacțiunea dintre substrat și grupările proteinei să favorizeze redistribuirea electronilor în cadrul moleculei de substrat, fenomen ce stă la baza modificării chimice mijlocite de enzima respectivă?

În momentul de față nu putem da un răspuns precis la nici una dintre aceste întrebări, deoarece nu cunoaștem la nici una dintre enzime structura exactă a zonei active. Cu toate acestea,

Scanned with OKEN Scanner

este evident că varietatea catenelor laterale de aminoacizi ce se găsesc la suprafaţa proteinelor, ca şi diversitatea de structuri terţiare posibile ce determină conformaţia lor tridimensională exactă permit proteinelor să prezinte o mare diversitate a detaliilor de structură a suprafeţei lor. Încorporarea de ioni metalici, de coenzime sau de alte grupări prostetice măreşte şi mai mult această diversitate. Avem deci toate motivele să presupunem că, în cazul unei enzime date, dispunerea grupărilor superficiale din zona activă va determina tipul de legături de hidrogen şi de interacţiuni electrostatice sau de hidrofobie posibile între proteină şi substrat, stabilind cu o precizie destul de mare categoria de molecule ce pot fi adsorbite pe zona respectivă.

În cazul enzimelor ce acţionează asupra unor molecule de substrat mici, la nivelul zonei active pot veni în contact direct cu substratul nu mai mult de 10—20 de resturi de aminoacizi. Cu toate acestea, enzimele mici conţin 100—200 de resturi de aminoacizi, iar enzimele mari, pînă la de zece ori mai multe. A fost deci firesc ca cei ce studiau chimia proteinelor să-şi pună întrebarea dacă, pentru a-şi desfăşura activitatea, este nevoie de întreaga moleculă a enzimei. S-au efectuat numeroase cercetări pentru a se vedea ce efect au modificările fizice şi chimice ale structurii enzimelor asupra funcţiei lor; a fost cercetată în special acţiunea unor agenţi care se combină în mod specific cu anumite catene laterale ale proteinelor, precum şi efectul exercitat de îndepărtarea unor peptide scurte de la capetele lanţurilor polipeptidice ale enzimelor. Dacă o asemenea modificare nu afectează în nici un fel activitatea enzimei, înseamnă că grupările cu care a reacţionat agentul respectiv sau care au fost îndepărtate nu erau esenţiale. Cînd, dimpotrivă, funcţia era abolită înseamnă că fuseseră afectate grupări esenţiale; acestea puteau fi sau grupări implicate direct în legarea substratului ori în activitatea catalitică a enzimei, sau grupări esenţiale pentru menţinerea structurii terţiare a enzimei şi a integrităţii zonei active.

S-a constatat că activitatea aproape a tuturor enzimelor este foarte sensibilă la denaturarea sau la modificarea structurii terţiare. Chiar în cazul limită al papainei, din a cărei moleculă se poate îndepărta aproape jumătate, rămînînd un fragment cu un singur lanţ peptidic de cca. 80 de resturi de aminoacizi, dar care reţine întreaga activitate enzimatică, această activi-

Scanned with OKEN Scanner

tate se pierde dacă fragmentul rămas este supus acţiunii unor factori denaturanţi, cum ar fi încălzirea sau un *p*H acid. Se pare, din cîte ştim pînă acum, că pentru a nu fi afectată este necesar ca o porţiune importantă din molecula ei, considerabil mai mare decît partea care vine în contact nemijlocit cu substratul, să-şi păstreze relativ intactă structura ei terţiară.

Este clar, din considerente generale asupra structurii proteinelor, că dacă lanţurile polipeptidice ale unei enzime sînt încolăcite într-un ghem strîns, grupările din catenele laterale aflate într-o zonă restrînsă de la suprafaţa enzimei nu trebuie neapărat să fie vecine şi în constituţia structurii primare a enzimei; ele au putut ajunge în contact unele cu altele prin încolăcirea în cadrul structurii terţiare sau prin agregarea subunităţilor în cadrul celei cuaternare. Faptul că activitatea enzimatică este de regulă atît de sensibilă la denaturare sugerează că, în cazul majorităţii enzimelor, zonele active cuprind grupări aparţinînd mai multor regiuni diferite ale structurii primare. Din moment ce structura terţiară şi cuaternară a unei proteine este determinată de interacţiunile dintre catenele ei laterale, este posibil ca o anumită proporţie din resturile de aminoacizi care nu vin în contact nemijlocit cu substratul la nivelul zonei active (dar care reprezintă 90—99% din totalul acestor resturi) să joace totuşi un rol structural esenţial; ele ar determina încolăcirea şi agregarea lanţurilor polipeptidice în aşa fel, încît să asigure exact acea conformaţie tridimensională a grupărilor din zona activă de care este nevoie pentru ca enzima să poată să se lege şi să interacţioneze cu substratul respectiv.

Este posibil, de asemenea, ca o parte din grupările care nu vin în contact direct cu substratul să aibă totuşi un rol destul de direct în activitatea enzimatică. Dacă specificitatea de legare a enzimei poate fi explicată numai prin elemente ce ţin de grupările prostetice ce vin în contact nemijlocit cu substratul, nu ştim încă în ce măsură activitatea catalitică a enzimei (adică redistribuirea electronilor din substrat) nu are cumva la bază interacţiuni a căror sferă se extinde mai profund în molecula de proteină. De altfel, s-ar putea ca unele porţiuni ale moleculei de enzimă care nu sînt necesare pentru ca ea să fie activă *in vitro*, să fie totuşi esenţiale pentru funcţionarea ei corectă *in vivo*, spre exemplu, prin ancorarea specifică a enzimei respective într-o anumită zonă din celulă.

Scanned with OKEN Scanner

Enzima asupra căreia dispunem pînă în prezent de cele mai multe informaţii este ribonucleaza; structura ei primară este redată în fig. 3.5. Îndepărtarea unui peptid de 20 de resturi de aminoacizi de la capătul aminic al lanţului sau a unui peptid cu 4 resturi de la capătul carboxilic duce la inactivarea enzimei. Se poate presupune deci că încolăcirea terţiară a moleculei aduce ambele capete ale lanţului în vecinătatea zonei active sau că, în orice caz, îndepărtarea acestor peptide modifică zona activă. Modificarea chimică a catenei laterale a lizinei din poziţia 41 (numărînd dinspre capătul liber aminic) sau a histidinei din poziţia 119 inactivează enzima; pe baza acestor date, ca şi a celor furnizate de rezultatele preliminare ale studiilor de difracţie cu raze X s-a elaborat un model tridimensional ipotetic al moleculei de ribonuclează. Analiza cu ajutorul razelor X a ribonucleazei nu este însă, pînă la ora actuală, nici pe departe atît de detaliată ca cea a mioglobinei şi hemoglobinei.

În momentul cînd cercetările asupra ribonucleazei sau asupra altor molecule enzimatice mici vor ajunge la nivelul la care sînt astăzi studiile asupra mioglobinei, se va atinge o nouă piatră de hotar de primă importanţă. Prin aceasta se va deschide drumul explorării amănunţite a mecanismului acţiunii enzimelor. Pentru această explorare, după cum se arată în anexa 2, descrierea grafică a structurii moleculare ce a fost folosită în această carte nu va mai fi adecvată. Cercetările mai precise în acest domeniu necesită o cunoaştere mai amănunţită a distribuţiei electronilor din interiorul moleculei de substrat, precum şi a modului în care cîmpurile de forţe ale grupărilor de pe zona activă a enzimei modifică această distribuţie.

MIOZINA, ACTINA ŞI CONTRACŢIA MUSCULARĂ

Examinate la microscopul cu contrast de fază, în lumină polarizată sau în preparate fixate şi colorate, celulele din muşchii striaţi şi din miocardul vertebratelor prezintă striaţiile transversale reproduse în fig. 4.17. Aceste striaţii sînt o caracteristică a fibrilelor individuale din interiorul celulei musculare şi faptul că ele pot fi văzute la măriri relativ mici, ca nişte benzi orientate perpendicular pe axul celulei, se datoreşte alăturării în aşa fel a marii majorităţi a fibrilelor, încît să se realizeze o

Scanned with OKEN Scanner

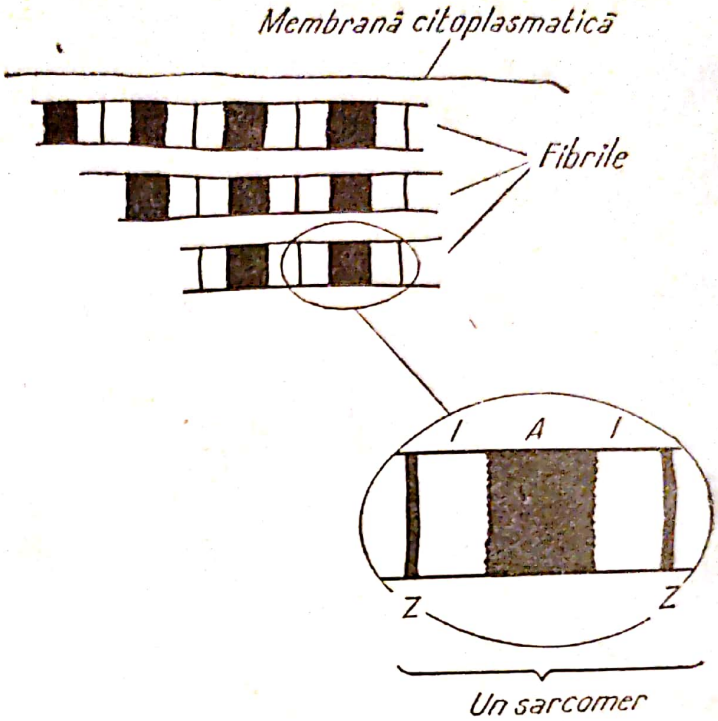


Fig. 4.17. Principalele elemente structurale ale unei celule musculare striate, așa cum apar pe preparate fixate sau la microscopul cu lumină polarizată.

Benzile diferitelor fibrile sînt în cea mai mare parte aliniate la același nivel pe toată lățimea celulei. Benzile *I* sînt optic izotrope iar cele *A*, anizotrope. Segmentul de fibrilă cuprins între două benzi *Z* vecine poartă denumirea de sarcomer.

aliniere a zonelor clare și întunecate. În preparatele examinate la microscopul optic și, mai clar, pe imaginile obținute la microscopul electronic (fig. 5.18) între fibrile pot fi puse în evidență mitocondrii, precum și un reticul membranos ce va fi descris în cap. 5. Mitocondriile sînt organitele care mobilizează, sub formă de ATP, energia necesară pentru contracția musculară (cap. 2).

În acest paragraf ne vom ocupa de proteinele musculare și de structura amănunțită a fibrilelor. În schema mărită din fig. 4.17 sînt reprezentate principalele elemente componente ale striațiilor : benzile *Z*, mai evidente, și benzile *A* și *I*, denumite astfel datorită faptului că, în lumina polarizată, ele ne apar anizotrope și, respectiv, izotrope. Examinînd benzile *A* la microscopul electronic se observă că ele conțin un sistem de filamente în formă de bastonaș, lungi de aproximativ 1,5μ și cu un diametru de 10 mμ, dispuse toate paralel cu axul fibrilei și despărțite între ele prin spații de 30—40 mμ (fig. 4.18 și 4.19). Aceste filamente sînt aliniate și lungimea lor determină lungimea benzilor *A*. În secțiune transversală (fig. 4.20) se observă că ele sînt aranjate într-o dispoziție hexagonală. De-a lungul benzilor *I* sînt dispuse benzi mai subțiri și mai puțin rigide, cu un diametru

Scanned with OKEN Scanner

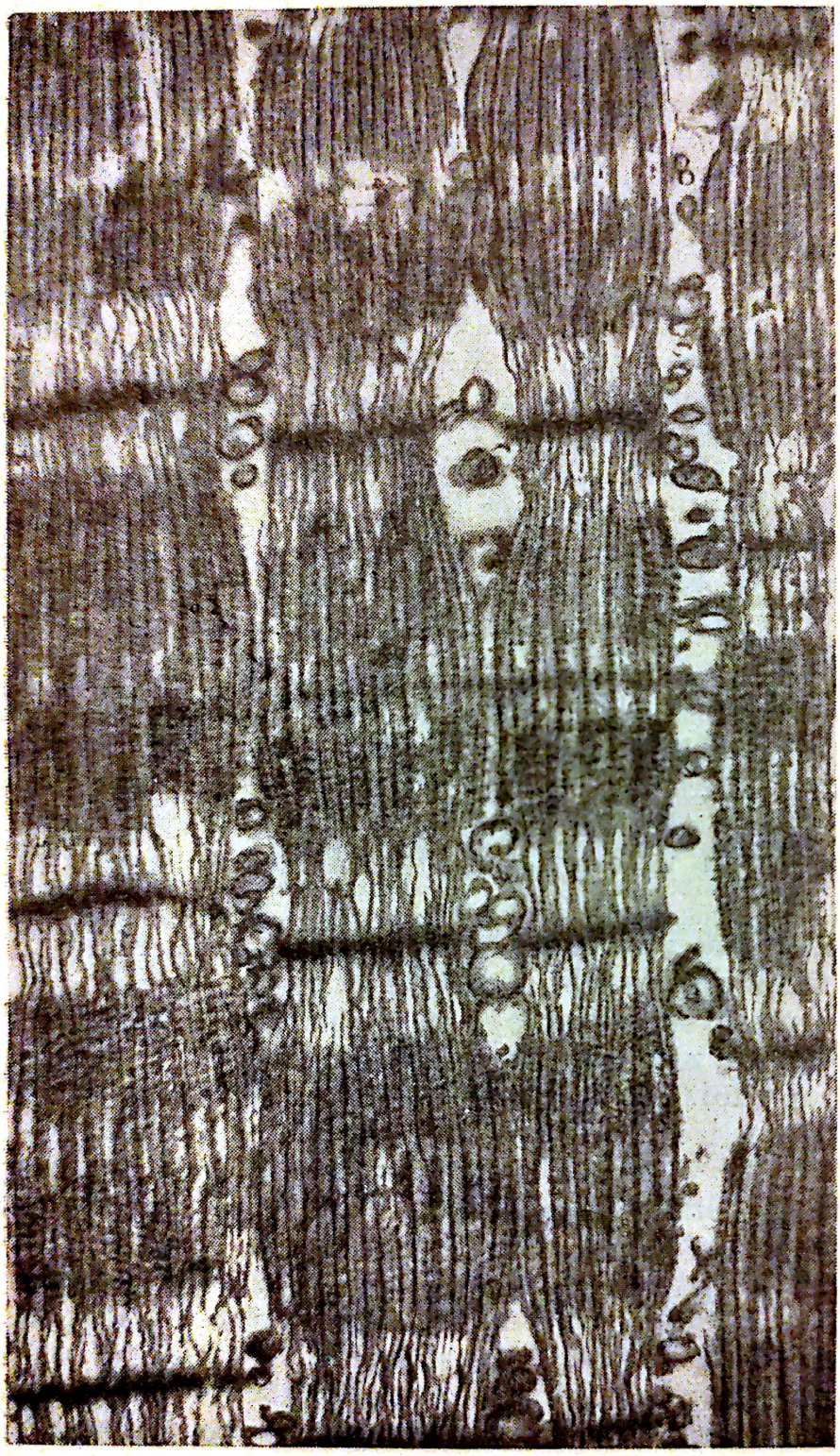


Fig. 4.18. Microelectronografie a unei secţiuni longitudinale prin muşchiul psoas de iepure (extracţie glicerolică), reprodusă la o mărire de 60 000 x.

Filamentele groase din benzile *A* sînt aliniate la acelaşi nivel. Filamentele subţiri pornesc de la benzile *Z*, străbat benzile *I* şi o parte din distanţa pînă la benzile *A* (după Huxley, 1957).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 4.19. Detaliu al unui sarcomer dintr-un preparat asemănător cu cel din fig. 4.18, mărit de două ori mai mult (mărire finală 120 000 x).

De remarcat punţile de legătură dintre filamentele groase şi cele subţiri (după Huxley, 1957.

de aproximativ 6 mμ, pătrunzînd pe o distanţă oarecare şi în domeniul benzilor *A*, printre filamentele groase ale acestora (fig. 4.18, 4.19 şi 4.20). Ele par să fie fixate pe o structură de

Scanned with OKEN Scanner

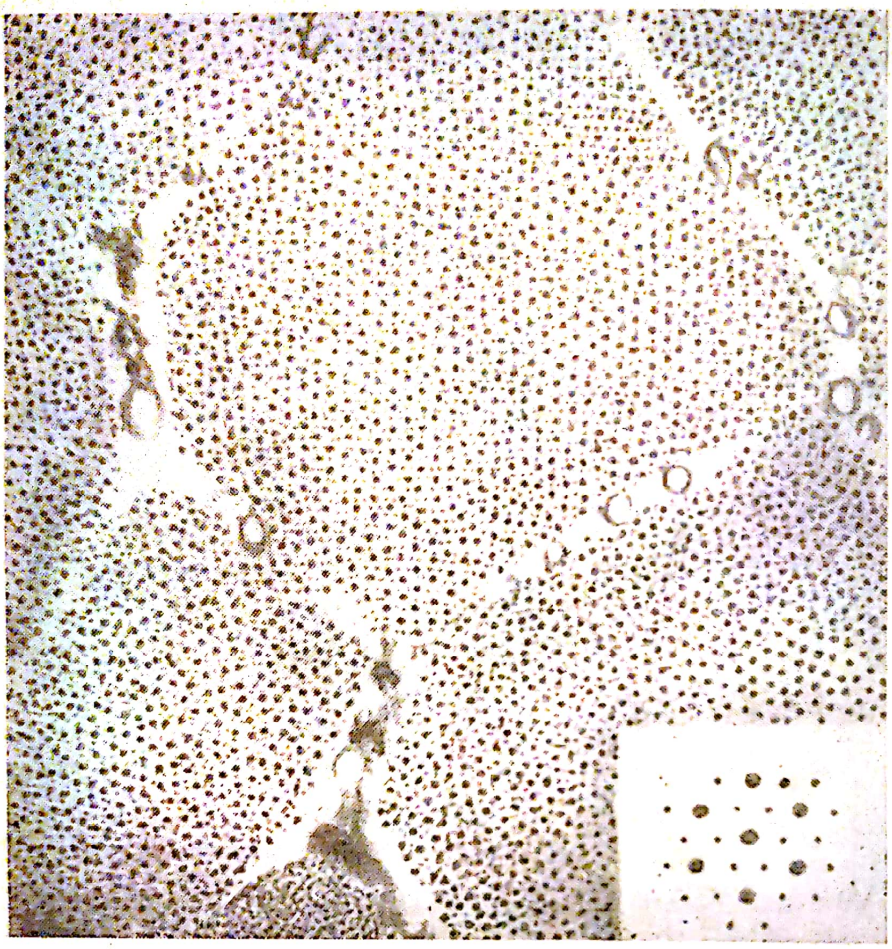


Fig. 4.20. Microelectronografie a unei secțiuni transversale prin mușchiul psoas de iepure (extracție glicerolică), la nivelul benzii *A*, unde se întrepătrund filamentele groase cu cele subțiri (mărire 67 000 x).

În medalion este reprezentat schematic modul de dispunere a acestor filamente. Fiecare filament gros este înconjurat de cîte șase filamente subțiri. În jurul fiecărui filament subțire sînt dispuse cîte 3 filamente groase și 3 subțiri (după Huxley și Hanson, 1960).

forma unei plăci, ce se găsește așezată de-a curmezișul fiecărei fibrile la nivelul benzii *Z*.

După o serie de controverse, pare destul de bine stabilit astăzi că în cursul contracției normale a mușchiului striat (ce reduce lungimea mușchiului la cca. 60% din cea în stare de repaus) lungimea benzii *A* rămîne constantă și că scurtarea, ce se produce în mod uniform de-a lungul fiecărei fibrile, are la bază o scurtare a benzilor *I*. Întinderea mușchiului dincolo de lungimea sa din perioada de repaus duce la lungirea tot numai a benzilor *I*. Se pare că în cursul întinderii sau al contracției moderate pînă la atingerea unei lungimi de 85% din cea proprie stării de repaus are loc o deplasare a filamentelor subțiri care ies sau pătrund mai mult sau mai puțin în interiorul benzii *A*, fără a se produce lungirea sau scurtarea fiecărui filament în parte (fig. 4.21). Zona de suprapunere a filamentelor subțiri cu cele groase devine mai mică în cursul întinderii și mai mare în cursul contracției. Cînd lungimea mușchiului atinge 85% din

Scanned with OKEN Scanner

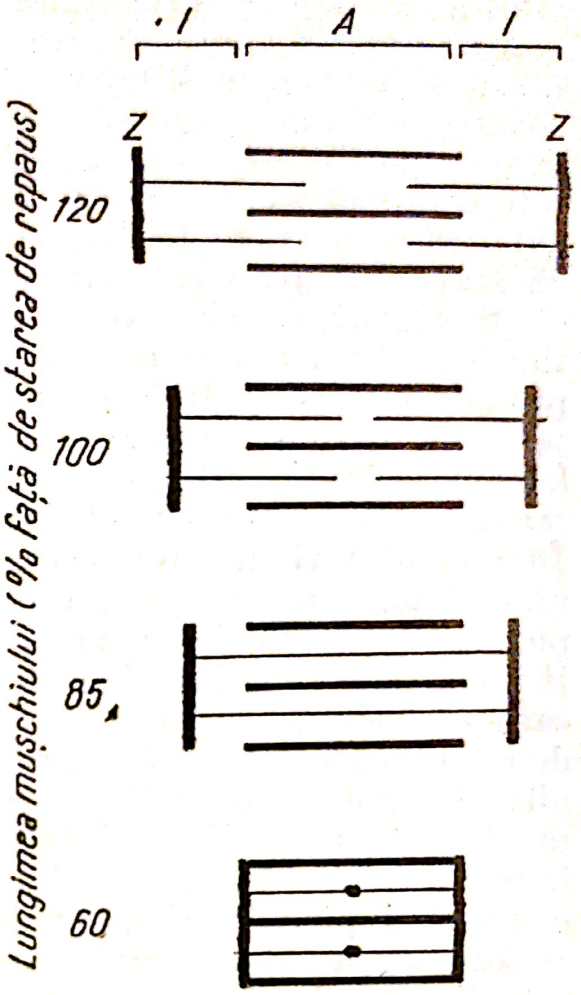


Fig. 4.21. Schemă ilustrînd deplasarea filamentelor subțiri în raport cu cele groase în cursul întinderii mușchiului și al contracției sale pînă la 60% din lungimea pe care o are în stare de repaus (limitele contracției fiziologice) (după Finean, 1961).

lungimea proprie stării de repaus, filamentele subțiri ce vin dinspre două benzi *Z* vecine se întîlnesc în centrul benzii *A* dintre ele; cînd contracția progresează, ajungînd de la 85% la 60% din lungimea caracteristică stării de repaus, filamentele sînt obligate să se ghemuiască sau să se încalece într-un fel oarecare în zona centrală a benzii *A* (fig. 4.21).

Controversa cu privire la corectitudinea acestei imagini asupra deplasării și întrepătrunderii filamentelor în cursul contracției a provenit din dificultatea măsurării cu precizie a modificărilor lungimii benzilor cu ajutorul tehnicilor de microscopie în lumină polarizată și al celor cu interferență, dat fiind că aceste schimbări, de mai puțin de 1μ, se găsesc la limita puterii separatoare a microscopului optic. În cercetările de microscopie electronică au apărut în schimb dificultăți ca urmare a modifi-

Scanned with OKEN Scanner

cării dimensiunilor prin procedeele de preparare. Micşorarea globală poate fi apreciată prin compararea lungimii sarcomerelor (distanţa dintre două benzi *Z*) din preparatele vii cu a celor fixate, dar nu este sigur că procedeele preparative duc la o reducere proporţională a benzilor *A* şi *I*. Cu toate că aceste dificultăţi continuă să persiste într-o oarecare măsură, mecanismul „alunecării filamentelor" descris mai sus, propus iniţial de H. E. Huxley şi Jean Hanson pe baza cercetărilor de microscopie electronică şi de microscopie cu contrast de fază efectuate pe fibrele izolate, a fost larg acceptat din mai multe motive. În primul rînd, cercetările amănunţite de microscopie cu interferenţă efectuate de A. F. Huxley şi R. Niedergerke asupra celulelor musculare intacte confirmă faptul că dimensiunile benzilor *A* rămîn constante în cursul întinderii şi contracţiei moderate. În al doilea rînd, anumite proprietăţi fiziologice ale celulelor musculare, spre exemplu, raportul existent între tensiunea ce poate fi generată de un muşchi întins şi gradul întinderii, pot fi interpretate cel mai bine pe baza reducerii gradului de încălecare a filamentelor. În al treilea rînd, indiferent de modificările de dimensiuni produse în cursul procedeelor preparative, imaginile electronoptice arată un grad scăzut de încălecare a filamentelor în muşchii fixaţi în contracţie. Mecanismul alunecării filamentelor poate acţiona, în forma sa simplă, numai în cazul contracţiei pînă la 85% din lungimea muşchiului în stare de repaus sau, cu o oarecare încreţire ori încălecare a filamentelor subţiri, pînă la 60% din această lungime. Muşchii striaţi sînt însă capabili ca, în condiţii nefiziologice, să se contracte pînă la atingerea unei lungimi de 30% din cea proprie stării de repaus. Contracţia de 60% pînă la 30% din lungimea de repaus trebuie să fie însoţită de o scurtare a benzilor *A* şi de o îndoire sau încreţire a filamentelor groase.

Din muşchi poate fi extrasă o varietate de proteine diferite. Miozina sau actina alcătuiesc împreună 55% din proteinele totale ale muşchiului striat; alte proteine existente în cantităţi variabile sînt tropomiozina şi mioglobina. Szent-Györgyi a arătat în 1942 că, prin adăugare de ATP , se poate provoca contractarea unor filamente proteice mixte formate din miozină şi actină. Se pare deci că aceste două proteine sînt cele mai importante componente ale structurii contractile a fibrilelor musculare.

Miozina este o proteină cu o greutate moleculară de ~500 000,

Scanned with OKEN Scanner

ce reprezintă aproximativ 40% din totalul proteinelor musculare (din mușchii striați ai vertebratelor). Este o moleculă lungă (150—200 mμ) și subțire (2—3 mμ diametru), formată probabil din două sau trei α-helixuri răsucite împreună ca sforile într-o frînghie. Aceste molecule prezintă activitate ATP-azică, fiind capabile să scindeze gruparea fosfatică terminală macroergică din molecula de ATP ; *in vitro*, în condiții fiziologice de *p*H și concentrație salină, ele se agregă cu ușurință formînd fibre. (Termenul de „fibră" utilizat la nivel molecular pentru a descrie agregarea unor subunități de proteine fibrilare nu trebuie confundat cu același termen utilizat la nivel histologic pentru a descrie celula musculară alungită. În această carte, termenul de fibră este întotdeauna folosit numai în primul sens.)

Actina este o proteină cu o greutate moleculară de ~ 60 000, reprezentînd aproximativ 15% din totalul proteinelor musculare. *In vitro*, moleculele ei se agregă cu ușurință formînd fibre ; amănuntele acestei agregări prezintă o anumită importanță, întrucît moleculele de actină încorporează ATP (sau ADP) sub forma unor grupări prostetice solid ancorate, ATP legat fiind scindat în cursul agregării. Acest proces ar putea avea deci legătură cu mecanismul contracției musculare. În soluțiile cu concentrație salină scăzută, moleculele de actină se găsesc fie sub forma unor molecule globulare cu o greutate moleculară ~ 70 000, fie, poate, ca dimeri cu o greutate moleculară de ~ 140 000 (alcătuiți din două asemenea subunități de cîte 70 000). Moleculele globulare sau dimerii se agregă sub formă de fibre în momentul în care concentrația salină este adusă la nivelul fiziologic, cu condiția prezenței ionilor de Mg^{++} și a grupării prostetice sub forma ei fosforilată (ATP). În cursul formării fibrelor, fosfatul terminal este scindat din molecula de ATP legată, ADP și ionii de Mg^{++} rămînînd legați de actină și fiind încorporați în fibră. Fibra de actină este o structură elicoidală care, în microelectronografiile obținute prin tehnica contrastului negativ, arată ca două șiraguri de mărgele înfășurate unul în jurul celuilalt. Fiecare mărgea are un diametru de 5—6 mμ și este probabil o unitate avînd o greutate moleculară de ~ 70 000. Fiecare tură completă a dublului helix este lungă de 70 mμ și conține 13 perechi de mărgele.

Există anumite dovezi, bazate pe aspectul fibrilelor din

Scanned with OKEN Scanner

celulele musculare supuse anumitor procedee de extracţie specifică, în sensul că filamentele groase vizibile la microscopul electronic ar fi constituite cu precădere din miozină iar filamentele subţiri, din actină în forma ei fibrilară. Întrucît agregarea *in vitro* a subunităţilor de actină, cît şi a celor de miozină duce la formarea unor filamente de lungime variabilă, rezultă că *in vivo* trebuie să existe un element component în filamentele din celula musculară sau un alt factor, pînă acum necunoscut, care să controleze această lungime (a se compara modul în care lanţurile de acid nucleic din VMT limitează agregarea subunităţilor în particula virală). Fiecare dintre filamentele groase vizibile la microscopul electronic, lungi de aproximativ 1,5 μ şi groase de 10 mμ, trebuie să conţină 100 pînă la 200 de unităţi de miozină cu greutate moleculară de ~ 500 000. Dispunerea regulată a filamentelor de miozină în celulele musculare poate fi comparată cu dispunerea regulată a bastonaşelor de VMT în tactoizi. (În ambele cazuri, menţinerea în această poziţie a bastonaşelor trebuie să fie efectul entropiei şi al forţelor cu rază mare de acţiune; unul dintre aceşti factori, de exemplu, va fi forţa de respingere electrostatică dintre particulele şi filamentele purtînd sarcini de acelaşi fel.)

Dacă filamentele groase şi cele subţiri vizibile în imaginile obţinute cu microscopul electronic sînt, într-adevăr, structuri reprezentînd agregate de miozină şi, respectiv, de actină, principala problemă de fiziologie musculară devine aceea a stabilirii corelaţiei dintre modificările biochimice şi ciclul contracţie-relaxare, în special a corelaţiei dintre scindarea grupării fosfatice terminale a moleculelor de ATP şi deplasările relative ale filamentelor de actină şi miozină.

Dacă se amestecă între ele soluţii purificate de actină şi de miozină în prezenţa unei concentraţii saline relativ ridicate şi apoi se reduce această din urmă concentraţie pînă la valori fiziologice, soluţia se gelifică drept urmare a interconectării moleculelor de actină şi miozină. Prin tehnici adecvate se poate obţine o concentrare a moleculelor proteice din aceste geluri actomiozinice, precum şi o orientare a lor cu formarea de filamente. În absenţa ATP, aceste filamente sînt relativ inextensibile, dar dacă se adaugă ATP în condiţii experimentale în care să fie inhibată activitatea ATP-azică a miozinei, filamentele devin extensibile cu uşurinţă. Activitatea ATP-azică a miozinei

Scanned with OKEN Scanner

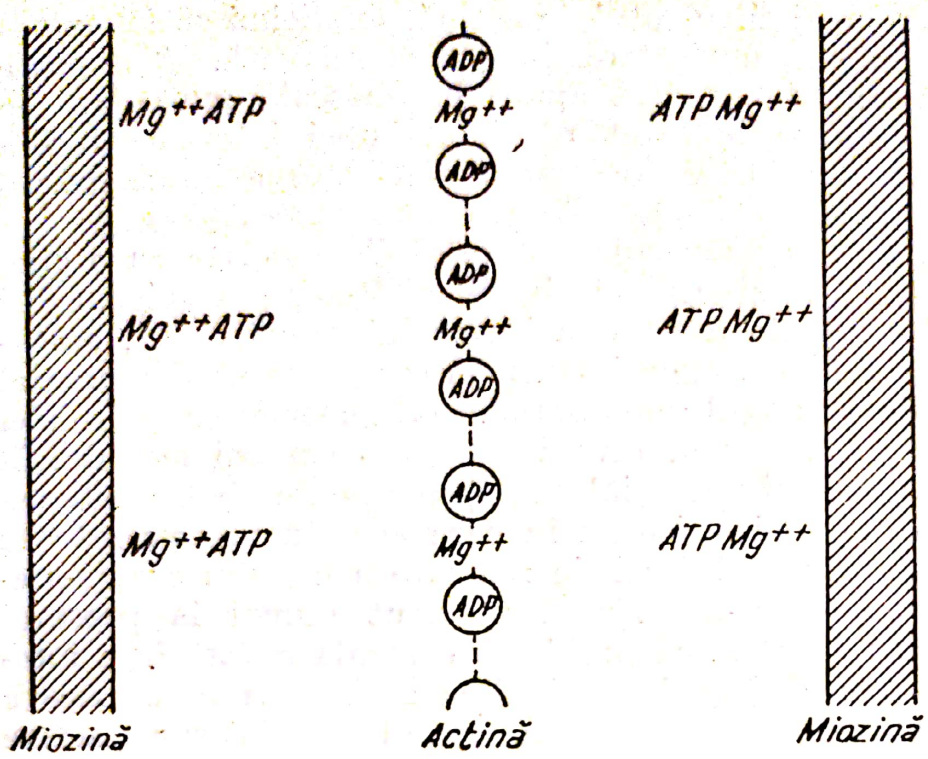


Fig. 4.22. Reprezentarea schematică ipotetică astării filamentelor de actină și miozină în mușchiul relaxat normal (vezi text) (după Perry, 1956).

poate fi inhibată prin ajustarea corespunzătoare a concentrației ionilor de Ca^{++} și Mg^{++} etc. și atunci cînd această activitate enzimatică este inhibată, prezența ATP tinde să rupă interconexiunile dintre actină și miozină. Dacă modificăm acum condițiile (prin schimbarea concentrației de Ca^{++}, Mg^{++} etc.) în sensul abolirii inhibiției ATP-azei, filamentele se contractă și dezvoltă o anumită tensiune. Din toate aceste puncte de vedere există un paralelism între comportarea filamentelor de actomiozină și cea a extractelor glicerolice de celule musculare, din care au fost îndepărtate sau inactivate aproape toate componentele celulare cu excepția proteinelor din fibrile.

În celulele musculare vii, relaxate, ritmul de scindare a ATP este relativ scăzut; în condiții de repaus, activitatea ATP-azică a miozinei *in vivo* este deci în mare măsură inhibată. O ilustrare ipotetică a stării fibrilelor musculare din mușchiul în repaus este redată în fig. 4.22. Actina este reprezentată sub forma unui filament de dimeri, de fiecare fiind legate cîte două molecule de ADP și un ion de Mg^{++}. În miozină, ATP și ionii de Mg^{++} sînt reprezentați ca fiind legați de zonele ATP-azice, fără ca ATP să fie scindat. Se presupune că ATP legat pe zonele respective ale miozinei împiedică formarea de interconexiuni

între aceste zone şi filamentul de actină, explicînd astfel extensibilitatea celulelor musculare în stare relaxată. (Se poate considera că rigiditatea care apare în oboseala musculară ca şi rigiditatea cadaverică sînt rezultatul unei interconectări a actinei cu miozina, care însoţeşte o scădere a concentraţiei intracelulare a ATP.)

Construcţia celulei musculare pare să fie asociată cu o abolire temporară a inhibării activităţii ATP-azice a miozinei şi poate fi provocată de injectarea intracelulară de Ca^{++}, acetilcolină şi o serie de alţi agenţi sau prin scurgerea unui potenţial de acţiune de-a lungul membranei citoplasmatice a celulei musculare. În cap. 6 vom reveni asupra discutării modului în care scurgerea acestui potenţial de acţiune poate aboli inhibarea ATP-azei miozinice şi a felului în care această inhibiţie poate fi reinstaurată în cursul fazei de relaxare a ciclului contracţie-relaxare. Restrîngîndu-ne pentru moment numai la procesul contractil însuşi, se pare că problema centrală constă în a înţelege cum se explică faptul că abolirea activităţii ATP-azice a miozinei, scindarea consecutivă a ATP de la nivelul zonei active a miozinei şi interacţiunea acesteia cu filamentele de actină la nivelul acestor zone, fenomen despre care ştim că are loc în momentul în care ATP este desprins de pe miozină, pot genera o mişcare unidirecţională a fibrelor de actină de-a lungul celor de miozină. H. H. Weber a propus pentru acest proces o schemă detaliată în care reacţiile chimice sînt în esenţă similare cu reacţiile dintre acizii graşi şi CoA în cursul sintezei acestora, iar A. F. Huxley a sugerat un model amănunţit al modului în care punţile perpendiculare vizibile în imaginile electronoptice (fig. 4.19) ar putea lua parte la procesul contractil. În alte scheme care au fost propuse nu sînt prevăzute nici un fel de contacte directe între actină şi miozină în cursul contracţiei normale, ci doar interacţiuni electrostatice cu rază mare de acţiune între grupările cu sarcină electrică de pe cele două tipuri de filamente. Faptul că în momentul de faţă pot fi elaborate ipoteze atît de amănunţite ca acelea de mai sus, ce pot fi confruntate cu datele cantitative cunoscute despre contracţia musculară, reprezintă o măsură a progresului realizat în studiul localizării zonelor de pe structura musculară în care are loc transformarea energiei chimice a ATP în energia mecanică a contracţiei. Problema modului în care are loc această transformare rămîne încă nerezolvată.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5

EXAMINAREA CELULELOR LA MICROSCOPUL ELECTRONIC

În capitolele anterioare am descris unele aspecte ale activităţii celulare care pot fi examinate pe celule vii şi am discutat o serie de caracteristici ale activităţii biochimice şi ale structurii moleculare ce stau la baza manifestărilor observabile. Dacă scara dimensiunilor fenomenelor biochimice (cum ar fi scinderea unei molecule mici de către o enzimă) este comparată cu scara fenomenelor ce pot fi examinate cu ajutorul microscopului optic, este clar că între ele există o prăpastie mare. Dacă am mări o celulă de aproximativ zece milioane de ori, astfel ca o mitocondrie mică să atingă dimensiunile unui automobil, moleculele mici ar fi abia de mărimea unor nuci sau a unor cuie iar moleculele proteinelor mici ar avea mărimea unei şurubelniţe. La microscopul optic, mitocondria mică apare ca un punct şi nu vedem nimic din structura, asamblarea sau funcţia ei. De aceea, pentru a ajunge să cunoaştem dispoziţia şi funcţia în celulă a enzimelor şi a altor macromolecule, trebuie să recurgem la cercetări morfologice mai fine decît cele pe care ni le permite microscopul optic. Aceste cercetări, pe care ni le îngăduie microscopul electronic, vor fi discutate în capitolul de faţă.

Din punct de vedere practic, *puterea separatoare* a unui microscop poate fi definită ca cea mai mică distanţă separînd două obiecte (măsurată între centrele lor), la care acestea mai pot fi văzute distinct; perechi de obiecte mai strîns apropiate între ele decît puterea separatoare vor apărea ca o singură pată. Puterea separatoare determină capacitatea maximă de mărire utilă. Se poate demonstra teoretic, plecînd de la datele asupra naturii ondulatorii a luminii şi se poate verifica direct experimental că gradul de separare obţinut cu un microscop nu poate

fi coborît cu mult sub jumătatea lungimii de undă a fasciculului de raze ce asigură iluminarea. Astfel, puterea separatoare a microscopului optic obişnuit este de cca. 200 mμ, permiţînd o mărire maximă utilă de 1 500 de ori.

Ameliorarea gradului de separare poate fi realizată numai prin utilizarea unei iluminări cu radiaţii de lungime de undă mai scurtă. Un progres oarecare a fost realizat prin recurgerea la lumină ultravioletă. Dintre undele electromagnetice cu lungime de undă mai scurtă fac parte şi razele X şi acestea ar părea să fie mijlocul potrivit de utilizat, dar pînă acum nu au putut fi realizate lentile eficiente pentru concentrarea razelor X. S-au construit microscoape cu raze X, utilizîndu-se simpla mărire geometrică obţinută prin divergenţa de la o sursă slabă, dar gradul de separare astfel atins nu este superior celui al microscopului optic obişnuit. Cea mai bună soluţie a problemei măririi gradului de separare care s-a dovedit realizabilă practic pînă în prezent a constat în utilizarea unui fascicul de electroni. Electronii pot fi concentraţi cu ajutorul unor cîmpuri electromagnetice şi electrostatice, iar microscoapele electronice pot asigura astăzi o putere separatoare mai bună decît 1 mμ. O astfel de separare înseamnă că subunităţile proteice ale unor macromolecule, ca acelea ale virusului mozaicului tutunului (fig. 4.2 şi 4.3), mai pot fi încă deosebite, dar ea nu ne permite să vedem nici un detaliu al structurii terţiare sau secundare a fiecărei subunităţi. (O descriere a microscopului electronic şi o analiză a modului de formare a imaginii electronice sînt cuprinse în anexa 4.)

Puterea separatoare crescută a microscopului electronic faţă de a celui optic este plătită cu un preţ ridicat, deoarece fasciculul de electroni are o putere de penetraţie foarte limitată, aşa încît poate fi utilizat numai pentru examinarea de preparate foarte subţiri. În afară de aceasta, preparatul trebuie să fie examinat în vid, deoarece altminteri moleculele de gaz ar împrăştia fasciculul de electroni. Aceasta înseamnă că, înainte de examinare, celulele trebuie să fie fixate şi deshidratate. Procedeele adoptate sînt în principiu similare cu cele utilizate la prepararea secţiunilor de ţesut destinate examinării histologice curente la microscopul optic, cu deosebirea că, pentru a se putea obţine secţiuni suficient de subţiri, trebuie să se recurgă, ca material de incluzionare, la răşini sintetice în loc de parafină

Scanned with OKEN Scanner

și că trebuie utilizate microtoame speciale cu care se pot obține secțiuni de o grosime nu mai mare de 1/50μ. Secțiunile sînt montate pe grile de cupru și examinate prin ochiurile rețelei. Fixatorii cei mai buni pentru microscopia electronică sînt tetraoxidul de osmiu și permanganatul de potasiu, întrucît acești reactivi se combină specific cu anumiți constituenți celulari iar atomii grei de Mn și Os măresc contrastul acestor constituenți (vezi anexa 4).

Desigur, este greu să se interpreteze o imagine la microscopul electronic a unei celule moarte și fixate în raport cu structura sa moleculară din starea vie. Microscopia în contrast de fază a servit la recunoașterea artefactelor legate de manoperele de fixare și colorare, indispensabile pentru examinările la microscopul optic; structuri a căror existență reală a fost în trecut pusă la îndoială, cum ar fi corpusculii Nissl din neuroni și aparatul Golgi prezent în multe celule, pot fi evidențiate azi *in vivo*. Un asemenea mod de examinare a unor celule vii, sub microscopul electronic, este, din nefericire, imposibil pentru moment.

Deși s-au făcut unele progrese, prin construirea unor instrumente de foarte mare voltaj, care produc fascicule de electroni cu putere de penetrație mai mare, persistă — ca o dificultate inerentă — faptul că suprapunerea unor structuri creează confuzii în identificarea detaliilor chiar și în cele mai subțiri părți ale unei celule examinate în stare vie. O secțiune pentru microscopul electronic este de 50—100 de ori mai subțire decît una pentru microscopul obișnuit: micșorarea preciziei în identificarea diferitelor structuri ce ar decurge din suprapuneri, atunci cînd s-ar examina la microscopul electronic secțiuni de grosimea celor destinate microscopului obișnuit, poate fi apreciată după dificultățile pe care le-am întîmpina prin examinarea a 50 de clișee electronoptice ale unor secțiuni seriale, așezate unul peste altul. Necesitatea construirii unor microtoame capabile să taie secțiuni foarte fine, impusă de nevoia de a învinge dificultățile create de slaba putere de penetrație a fasciculului de electroni, s-a dovedit a ascunde de fapt o binefacere, deoarece la microscoapele electronice uzuale, la care cîmpul focalizat are o profunzime relativ mare, structurile fine pot fi distinse numai într-o secțiune subțire.

Microscopul optic poate fi utilizat pentru urmărirea unor modificări în timp, în schimb el are posibilități limitate de evi-

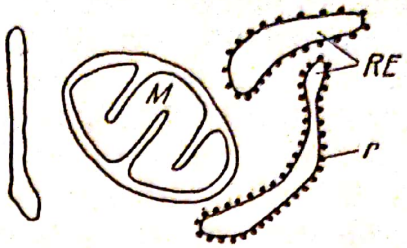
Scanned with OKEN Scanner

denţiere a detaliului în cele trei dimensiuni spaţiale. La microscopul electronic, dimensiunea *timp* este pierdută, dar este ameliorată puterea separatoare pentru imaginea bidimensională. Cea de a treia dimensiune poate fi adăugată imaginii obţinute la microscopul electronic prin studierea de secţiuni în serie sau de secţiuni tăiate în planuri variate, dar efectul factorului timp poate fi dedus numai prin examinarea de ţesuturi în diferite stadii ale ciclului lor funcţional.

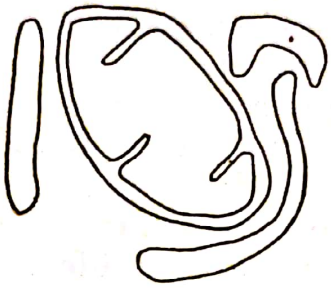
Limitările fiecărei metode de microscopie fac ca datele obţinute cu microscopul electronic să nu poată fi verificate direct. Dacă o celulă vie este examinată la microscopul cu contrast de fază în timpul fixării cu tetraoxid de osmiu, mişcările celulei se opresc brusc şi contrastul imaginii ei creşte, fără să se constate însă alte modificări vizibile. Această păstrare a structurii aparent satisfăcătoare la nivelul de separare al microscopului optic nu înseamnă însă neapărat că şi ultrastructura celulei este păstrată. În anumite cazuri, din fericire, se pot aduce şi alte probe în sprijinul valabilităţii unor concluzii bazate pe cercetări de microscopie electronică. De exemplu, acolo unde cercetări în lumină polarizată sau de difracţie cu raze X fac să se bănuiască o regularitate a ultrastructurii interne (structuri sub limita de rezoluţie a microscopului optic), ca în teaca de mielină a nervului sau în miofibrile, a fost posibil să se demonstreze o regularitate similară şi la examinarea aceluiaşi ţesut cu ajutorul microscopului electronic. S-a dovedit, pe de altă parte, că structuri mai mult sau mai puţin regulate, cum ar fi sacii paraleli vizibili n imaginile electronoptice ale unor secţiuni fine de celule pancreatice, prezintă o birefringenţă în celula vie. Există, de asemenea, o corespondenţă între structura reticulului sarcoplasmic din celulele muşchiului striat şi comportamentul fiziologic al acestora după aplicarea unui stimul local (cap. 6), corespondenţă care reprezintă şi ea o dovadă că imaginile obţinute la microscopul electronic evidenţiază o ultrastructură existentă *in vivo*.

O metodă histologică clasică pentru eliminarea artefactelor constă în a compara efectele diferiţilor fixatori. Numărul fixatorilor adecvaţi pentru microscopia electronică este foarte restrîns, dar între imaginile obţinute cu osmiu şi permanganat există o concordanţă marcată ; la rîndul lor, rezultatele obţinute cu aceşti fixatori chimici pot fi comparate cu imaginile electronoptice ale unor preparate congelate şi desicate (fig. 5.1). Dar

Scanned with OKEN Scanner



Fixare cu osmiu



Permanganat

Congelare - desicare

Fig. 5.1. Reprezentare schematică a aspectului unor organite intracelulare, așa cum apar pe microelectronografiile unor secțiuni de celule, după trei metode diferite de fixare (*M*-mitocondrie, *RE*-reticul endoplasmic, *r*-ribozomi).

chiar dacă asemenea probe indirecte ne determină să acceptăm microelectronografiile ca reprezentări fidele ale unei anumite părți a unei celule în momentul fixării, rămîn în continuare deschise problemele cunoașterii dinamicii activității celulare și ale interpretării microelectronografiilor în termenii structurii moleculare.

În ciuda acestor dificultăți, microscopul electronic a adus pînă acum contribuții considerabile în citologie, prin evidențierea în citoplasma celulelor a unei varietăți complexe de compartimente intracelulare și prin indicațiile furnizate în privința legăturii dintre aceste compartimente și fracțiunile subcelulare obținute prin omogenizare și centrifugare diferențiată. Microscopul electronic a arătat, de asemenea, că la periferia celulei se găsesc structuri specializate, de o nebănuită complexitate. Pe măsură ce varietatea celulelor examinate a crescut, s-a ajuns să se constate că aceste compartimente intracelulare și formațiile specializate periferice prezintă similitudini de structură în celule cu funcție similară ; acest lucru este valabil pentru multe specii și adesea pentru întregul regn animal și vegetal. Celulele cu funcție diferită prezintă ultrastructuri diferite. Aceste constatări reprezintă argumente suplimentare în sprijinul faptului că ima-

Scanned with OKEN Scanner

ginea electronoptică este — măcar într-o anumită măsură — în concordanţă cu structura materiei vii şi cu funcţiile acesteia.

Printre specialiştii în microscopie electronică s-a încetăţenit utilizarea termenului de „membrană" cînd se vorbeşte de despărţiturile dintre compartimentele intracelulare, vizibile pe microelectronografii sub formă de depozite de Os sau Mn folosite la fixare. De aceea este greu ca în capitolul de faţă, în care vom descrie aspectele celulei şi ale diferitelor ei compartimente vizibile pe microelectronografii, să evităm acest termen în această accepţie relativ largă. În cap. 6 vom reconsidera în mod mai critic ce anume structuri membranoase pot fi într-adevăr prezente la suprafaţa celulară şi la nivelul limitelor dintre compartimente. Trebuie să subliniem aici două lucruri: în primul rînd, nu se poate conchide că acolo unde două despărţituri intercompartimentare apar identice pe o microelectronografie, aceste despărţituri sînt reprezentate de membrane cu aceeaşi compoziţie moleculară şi cu aceleaşi proprietăţi de permeabilitate. În al doilea rînd, dimensiunile membranei *in vivo* pot fi complet diferite de cele ale stratului electronopac din preparatele fixate. Dacă numai anumite componente ale membranei sînt osmiofile sau dacă s-a produs o scădere de volum în cursul deshidratării şi incluzionării, dimensiunile reale pot fi mult mai mari decît cele deduse din imagine. Invers, este de asemenea posibil ca grosimea reală să fie mult mai mică decît reiese din imagine; o structură periferică foarte îngustă poate fi în mod artificial îngroşată prin acumularea de substanţă în cursul fixării.

STRUCTURI OBSERVABILE LA SUPRAFAŢA CELULEI

După utilizarea metodelor uzuale de fixare, incluzionare şi secţionare, microelectronografiile arată existenţa unui element caracteristic comun la nivelul suprafeţei tuturor celulelor; acesta constă într-o pereche de straturi opace la fasciculele de electroni, fiecare strat de 2—3 mμ fiind separat de celălalt printr-un spaţiu transparent, de obicei lat de 2—3 mμ. Această structură lamelară, dispusă la limita externă a citoplasmei, apare astfel în cele mai multe celule ca avînd o grosime totală de aproximativ

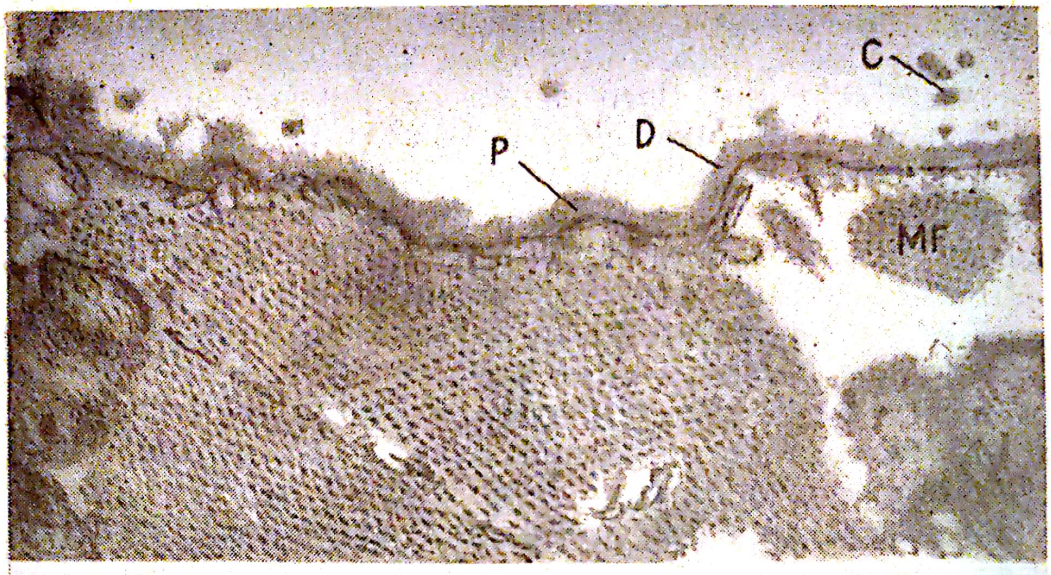
Scanned with OKEN Scanner

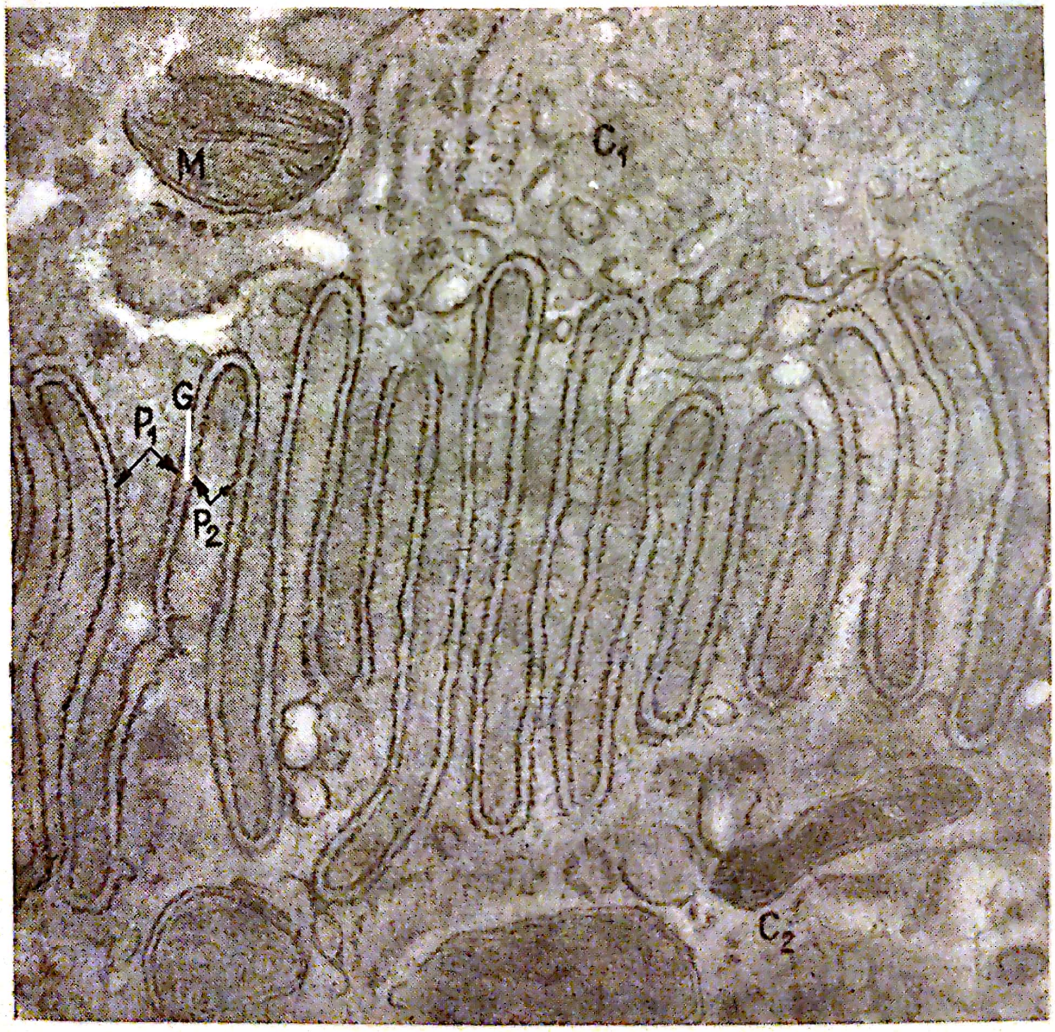
8 mμ. În globulele roşii ale sîngelui ea este singura structură observabilă la limita dintre citoplasma încărcată cu hemoglobină şi plasma sanguină. Socotim că este potrivit să atribuim acestui element vizibil pe microelectronografii denumirea de membrană citoplasmatică ; vom vedea în capitolul următor că există dovezi demne de luat în consideraţie pentru a o echivala cu membrana citoplasmatică, aşa cum a fost ea definită în cap. 1 (adică drept membrană care acţionează ca principală barieră în calea difuziunii spre interiorul şi exteriorul celulei). Membranele citoplasmatice ale bacteriilor prezintă în mod obişnuit aspectul tipic al membranelor citoplasmatice ale altor celule, deşi la anumite bacterii (de exemplu, la *Staphylococcus aureus*) ele apar ca avînd doar o grosime de 5 mμ.

La majoritatea celulelor se constată că pe imaginile electronoptice suprafaţa externă a membranei citoplasmatice apare acoperită cu un material difuz, avînd o grosime de aproximativ 40 mμ şi care nu are o limită externă netă (fig. 5.2, imaginea de sus). Atunci cînd două celule sînt în contact (fig. 5.2, imaginea de jos), se constată că între membranele lor citoplasmatice există un spaţiu de cca. 15—20 mμ, umplut cu un material difuz similar. Aceste elemente sînt reprezentate schematic în fig. 5.3. Adesea spaţiul găsit între membranele citoplasmatice este mai larg de 20 mμ, dar este demn de remarcat că, de regulă, el nu este mai îngust de 15 mμ. Soluţiile hipertonice reduc dimensiunile spaţiului, ceea ce sugerează că materialul difuz ce umple acest spaţiu este poate un gel hidratat. Nu este de aşteptat ca acest gel să afecteze mult difuziunea liberă a moleculelor mici sau a ionilor prin interstiţiile largi de 15—20 mμ dintre celule, deşi ar fi posibil ca el să limiteze mişcarea moleculelor mari de proteină.

Este greu de apreciat cît de strînsă este corespondenţa dintre dimensiunile acestor spaţii vizibile în preparatele fixate şi dimensiunile lor *in vivo*, dar anumite experienţe efectuate pe axoni giganţi de sepie sugerează că în ţesuturile vii există, între celule, spaţii cu conţinut apos care au aproximativ aceste dimensiuni. Axonii de sepie sînt înconjuraţi de celule Schwann alăturate, iar microelectronografiile evidenţiază un spaţiu tipic de 15—20 mμ între membranele citoplasmatice ; un spaţiu similar poate fi văzut între membranele citoplasmatice ale axonului şi ale celulei Schwann. Dacă pe axon se aplică un stimul electric,

Scanned with OKEN Scanner





Scanned with OKEN Scanner

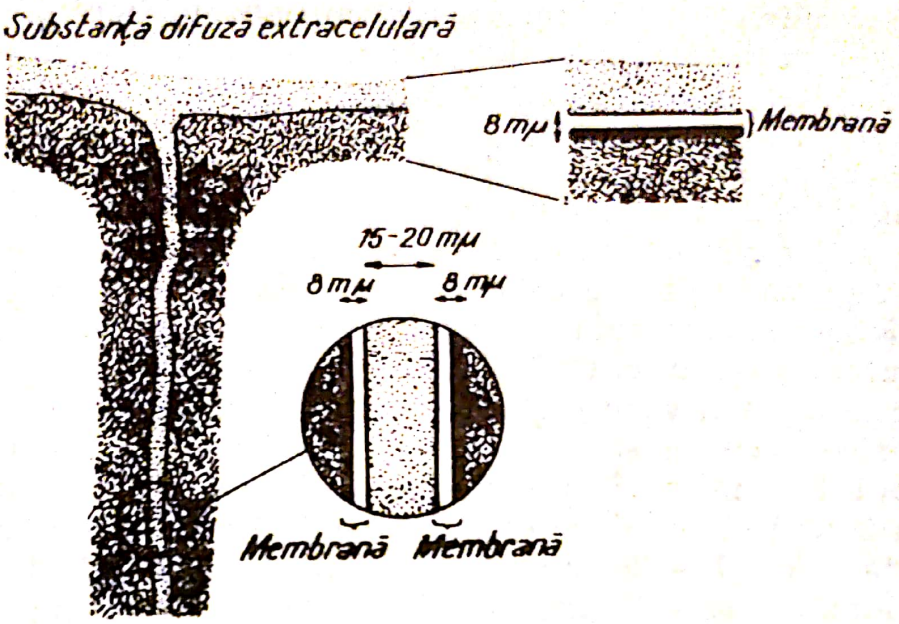


Fig. 5.3. Reprezentare schematică a structurii fine a suprafeței celulare.

Sînt figurate două celule tisulare vecine, parte din suprafețele lor fiind alăturate și parte expuse spre spațiul extracelular. Membranele citoplasmatice ale acestor celule sînt reprezentate printr-o singură linie densă, așa cum ar apărea la mărirea corespunzătoare fig. 5.2. Aspectul și dimensiunile lor, la o mărire mare, sînt figurate în cele două medalioane. Substanța difuză extracelulară poate lipsi în anumite situații (de exemplu, la celulele sanguine și la nivelul suprafeței libere a celulelor epiteliale).

provocîndu-se transmisia unui impuls nervos, ionii de sodiu pătrund spre interiorul axonului, iar cei de potasiu se scurg în afara lui. Curentul de ioni din mediul exterior spre suprafața externă a mebranei citoplasmatice a axonului este foarte rapid și demonstrează difuziunea nestingherită a ionilor, fie prin spațiile intercelulare dintre celulele Schwann, fie — mai puțin probabil — traversînd celulele Schwann. Dacă însă stimulul este repetat

---

Fig. 5.2. Microelectronografii înfățișînd aspectul periferiei celulare după fixare cu osmiu și secționare.

Imaginea (mărire 40 000 x) redă o parte a citoplasmei unei celule din miocardul de șobolan, conținînd miofibrile (MF) în secțiune transversală. La această mărire se vede un strat osmiofil întunecat (*P*) care separă citoplasma de spațiul extracelular de deasupra. (La o mărire mai mare, acest strat prezintă aspectul caracteristic al membranelor citoplasmatice — vezi text.) Un strat de substanță difuză (*D*), gros de aproximativ 50 mμ acoperă suprafața externă a stratului osmiofil, iar în spațiul extracelular se găsesc fibre de colagen (*C*). Imaginea de jos (mărire 66 000 x) reprezintă două celule epiteliale alăturate (C_1 și C_2) din intestinul de șobolan, ale căror membrane citoplasmatice (P_1 și P_2) plisate traversează cîmpul. Un spațiu (*G*), totdeauna prezent, larg de 15—20 mμ, separă membranele celor două celule. În citoplasma fiecărei celule se observă mitocondrii (*M*) și multe alte structuri membranoase.

Scanned with OKEN Scanner

de multe ori, difuziunea ionilor nu este suficient de rapidă pentru a evita acumularea de potasiu în spaţiul dintre membranele citoplasmatice ale axonului şi ale celulelor Schwann. Măsura acestei acumulări, apreciată după modificarea potenţialului de membrană al axonului în stare de repaus, sugerează că *in vivo* acest spaţiu este de aproximativ 30 mμ.

Alte probe indicînd că aceste spaţii înguste dintre celule ar putea fi canale de difuziune relativ liberă derivă din cercetări de microscopie electronică efectuate asupra celulei epiteliale intestinale în cursul absorbţiei de grăsimi. În spaţiile dintre celule pot fi văzute globule de grăsime ce împing în lături membranele citoplasmatice situate faţă în faţă, pe măsură ce globulul se mişcă înspre vasele chilifere din vilozitate. După ce a trecut globulul de grăsime, spaţiul revine la dimensiunea normală de 15—20 mμ. Aceste date sugerează deci că formaţii globulare sau de altă formă, mai mari de 20 mμ se pot deplasa de-a lungul spaţiilor. Alte probe sînt furnizate de celulele tubilor renali: aria suprafeţei bazale a celulelor este mult mărită prin formarea unor invaginări multiple, o specializare care este probabil în legătură cu transportul intensiv de metaboliţi prin membrana citoplasmatică a acestor celule în cursul reabsorbţiei tubulare. Cutele sînt separate unele de altele prin spaţii de 15—20 mμ. Această plisare nu ar mări suprafaţa eficientă a membranei citoplasmatice dacă nu ar exista posibilitatea unei difuziuni libere în spaţiul dintre membrane.

Acolo unde există o membrană bazală a unui epiteliu, ea este alcătuită dintr-o reţea împletită din fibre fine de colagen (fibre de reticulină) înglobate într-o masă de substanţă fundamentală care, pe microelectronografii, se pierde imperceptibil în materialul ce formează stratul de 40 mμ (lipsit de fibre) dispus imediat în afara membranei citoplasmatice. S-ar părea de aceea că materialul difuz găsit în jurul celulelor şi în interstiţiile dintre celule ar putea fi substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv, despre care se ştie — din cercetări histochimice făcute la microscopul optic — că conţine acid hialuronic şi alţi mucopolizaharizi nesulfataţi. Dacă ţesutul este supus la tensiune, atunci în membranele bazale se găsesc fibre de colagen mai groase. Acest aspect se întîlneşte, de exemplu, la nivelul inserţiei unei celule musculare striate fie pe tendon, fie pe chitină sau pe os. În oase, cartilaje sau în ţesutul fibros alb, materialul extra-

Scanned with OKEN Scanner

celular este acela care conferă ţesutului proprietăţile sale caracteristice. În cartilaj, materialul extracelular conţine mucopolizaharizi sulfataţi, în ţesutul fibros alb el conţine cantităţi mari de fibre de colagen orientate, iar în oase de-a lungul fibrelor de colagen sînt aşezate, într-o dispoziţie regulată, cristale de apatită (cap. 4). În toate aceste cazuri există o tranziţie aproape imperceptibilă între materialul difuz pericelular şi structurile intercelulare. În structurile dispuse la exteriorul membranei citoplasmatice a celulelor vegetale şi bacteriene, polizaharizii joacă un rol structural mai important, formînd pereţii de celuloză ai plantelor, precum şi capsulele şi învelişurile mucoase ale bacteriilor.

DESMOZOMII ŞI BARELE TERMINALE

Capacitatea de distensie a interstiţiului obişnuit, de 15—20 mμ, ce înconjură celulele reunite între ele — amintită mai sus —, sugerează că este nevoie doar de o forţă slabă pentru a separa două membrane astfel alăturate, deşi, dacă aşa stau lucrurile, înseamnă că la organismele superioare trebuie să existe un mijloc de cimentare laolaltă a celulelor. La plante, precum şi în oasele şi cartilajele vertebratelor, această cimentare este asigurată de natura rigidă a substanţei intercelulare. În epitelii, în glande şi în celulele musculare ramificate ale miocardului, unde celulele sînt supuse unor forţe de forfecare, s-ar părea că trebuie să intervină mijloace directe de adeziune intercelulare. Pe microelectronografii se pot vedea structuri care par să îndeplinească această funcţie. Ele sînt de două tipuri, fiind denumite desmozomi şi bare terminale.

Desmozomii sînt zone de contact limitate, cu dimensiuni mai mici de 1μ, şi apar ca modificări ale suprafeţelor alăturate a două celule (fig. 5.4). Cele două membrane citoplasmatice sînt dispuse paralel una faţă de cealaltă, fiind separate printr-un spaţiu de 13 mμ între suprafeţele lor externe; acest spaţiu este subîmpărţit în două de o linie densă, astfel încît la nivelul desmozomilor se observă o serie de cinci straturi dense paralele,

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 5.4. Microelectronografie ilustrînd structura desmozomilor (mărirea 120 000 x).

Trei celule epiteliale intestinale se întîlnesc la punctul *X*, membranele lor (*P*), alăturate, străbătînd cîmpul în trei direcţii. O caracteristică evidentă a celor doi desmozomi (*D*) constă în apariţia la acest nivel a unor plăci dense osmiofile de partea internă a membranei citoplasmatice. De aceste plăci sînt legate fibrile citoplasmatice (*F*). La nivelul desmozomului se poate vedea că spaţiul intercelular dintre cele două membrane citoplasmatice este subdivizat de o linie întunecată suplimentară.

între care se întercalează patru straturi mai transparente. Celulele prevăzute cu desmozomi conţin totdeauna elemente citoplasmatice fibroase, tonofibrilele, care converg spre suprafaţa internă a membranei citoplasmatice la nivelul desmozomului, de care par să fie legate. În epiteliul stratificat scuamos al pielii, tonofibrilele formează arcade prin toate celulele, ca o schelărie, şi sînt ataşate de numeroşi desmozomi de-a lungul întregii suprafeţe a celulei. Dacă aceste celule îşi micşorează volumul în cursul anumitor tratamente, ele rămîn legate unele de altele la nivelul desmozomilor, formîndu-se prin tracţiune un fel de spini de citoplasmă, de unde rezultă aspectul tipic spino-celular observabil la microscopul optic. Întregul epiteliu al pielii se sprijină pe o membrană bazală, iar stratul bazal de celule conţine *semidesmozomi*. Aceştia primesc inserţia tonofibrilelor pe faţa internă a membranei citoplasmatice, dar pe suprafaţa externă ele prezintă doar o structură tipică de membrană bazală cu fibre de reticulină înglobate în materialul difuz extracelular. Semidesmozomi similari se găsesc şi la inserţia miofibrilelor, la capătul celulei musculare striate, dar acolo unde celulele musculare sînt dispuse în serii, ca în cord, structuri foarte asemănătoare cu des-

Scanned with OKEN Scanner

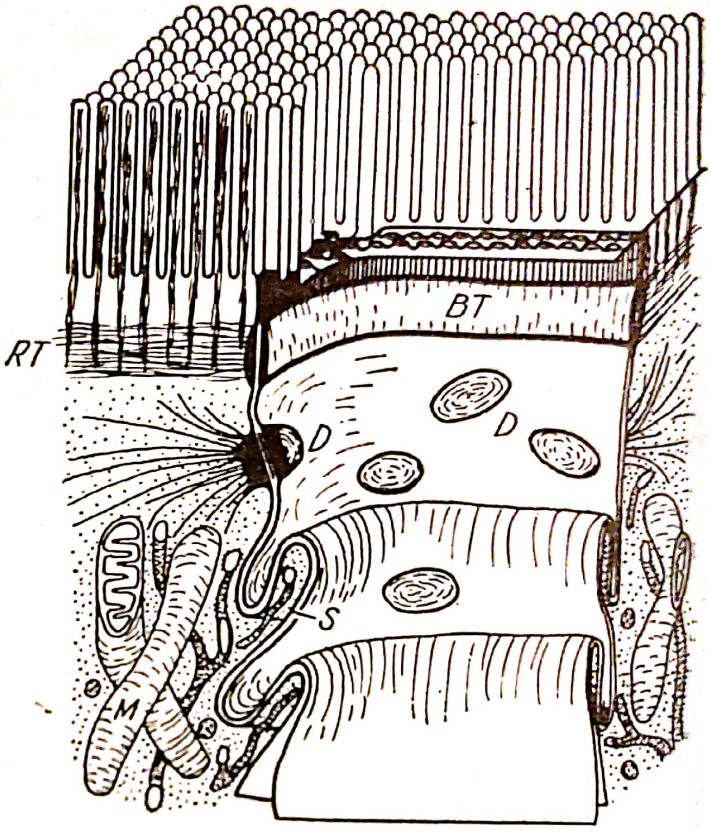


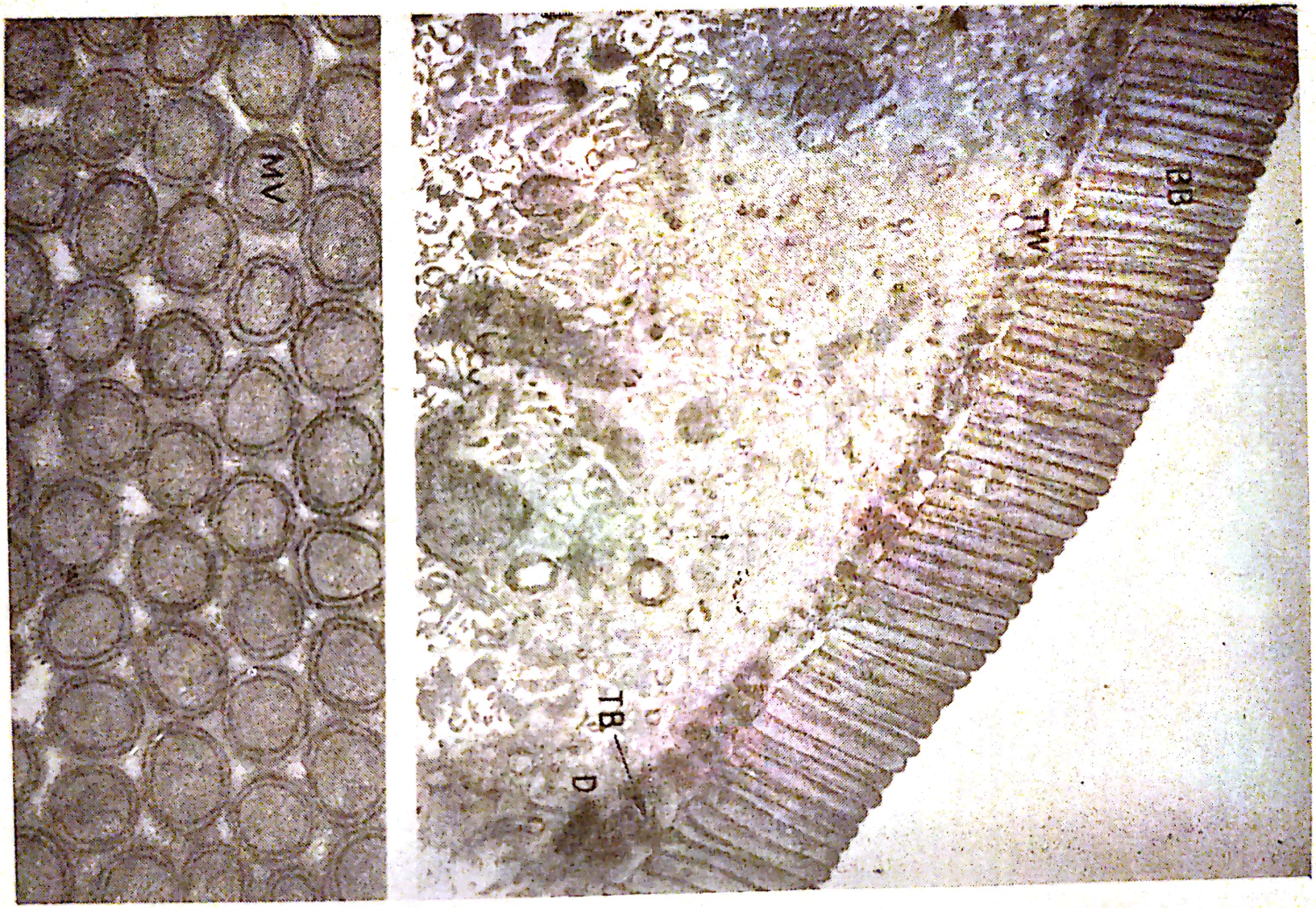
Fig. 5.5. Schiță tridimensională a unor celule epiteliale intestinale.

Schița reprezintă zona de contact dintre două celule, una dintre celule fiind golită de conținut pentru a se putea vedea suprafața internă a membranei sale citoplasmatice. Suprafețele celulelor care privesc spre lumenul intestinal sînt acoperite de microvilozități digitiforme care formează o „margine în perie" de-a lungul întregului epiteliu. Fiecare microvilozitate este parcursă de fibre care se inseră într-o rețea terminală (*RT*). Această rețea este atașată, la periferia celulei de bara terminală (*BT*) care încercuiește fiecare celulă ca un brîu. Imediat deasupra barei terminale, membranele celor două celule învecinate vin în contact intim, în rest fiind separate printr-nu spațiu de 15—20 mμ (S). Desmozomii (*D*) sînt structuri izolate, circulare sau ovoide, care par să cimenteze laolaltă membranele celulare alăturate (vezi text). Fibrilele rețelei terminale, precum și alte fibrile atașate de plăcile desmozomale, conferă citoplasmei apicale a fiecărei celule oarecare rigiditate. Cimentarea laolaltă a celulelor alăturate, pe care o realizează desmozomii și barele terminale, menține integritatea întregului epiteliu. În citoplasma celulelor se văd mitocondrii (*M*), elemente tubulare ale reticulului endoplasmic, granule mici și ribozomi.

mozomii formează discurile intercalate care transmit forța de contracție de la o celulă la cea următoare.

Desmozomii sînt structuri discontinue, izolate; barele terminale înconjură celula ca un inel sau ca un brîu. Ele leagă celulele laolaltă în foițe întinse formînd epiteliile vaselor sanguine și limfatice. Bare terminale se găsesc și la marginea internă a celulelor epiteliale intestinale (fig. 5.5 și 5.6). Ca și la desmozomi, membranele citoplasmatice sînt dispuse paralel una față de cealaltă și există, de asemenea aceeași separație între membrane, dar stratul extern al membranei citoplasmatice dispare la nivelul barei terminale și nu există o linie bisectoare, astfel încît între straturile interne ale celor două membrane citoplasmatice se formează un spațiu de aproximativ 30 mμ. Structura barei terminale apare astfel considerabil mai simplă decît aceea a

Scanned with OKEN Scanner


MV
BB
TW
TB
D

unui desmozom. În epiteliul intestinal există fibrile citoplasmatice fine inserate pe barele terminale, dar acesta nu este un caracter constant. Barele terminale sînt larg răspîndite: între celulele endoteliale ale vaselor sanguine, între celulele hepatice care formează un canalicul biliar, la marginea internă a tuturor celulelor glandulare secretorii şi a epiteliilor cilindrice, precum şi în multe alte locuri.

Microvilozităţile dens aglomerate ale celulelor epiteliale intestinale (fig. 5.5 şi 5.6) reprezintă un sistem de mărire a ariei de suprafaţă a acestor celule, probabil pentru a creşte ritmul de pătrundere în celulă a substanţelor pe care aceasta le preia din lumenul intestinal. O ,,margine în perie'' similară căptuşeşte lumenul tubilor renali.

În imediata apropiere a multor bare terminale, membranele citoplasmatice prezintă un caracter neobişnuit: materialul difuz pericelular lipseşte şi se constată că suprafeţele externe ale celor două membrane citoplasmatice vin în contact direct. Asemenea contacte au fost evidenţiate la marginea dinspre lumen a celulelor epiteliale intestinale şi renale, precum şi între celulele endoteliale. Observaţiile discutate mai înainte sugerează că spaţiul obişnuit dintre celule este permeabil pentru apă şi ioni; împreunarea membranelor citoplasmatice adiacente la nivelul acestor contacte din apropierea barelor terminale ar putea constitui elemente de restrîngere a difuziunii de-a lungul spaţiilor intercelulare (de exemplu, înspre lumenul intestinal). Probe experimentale în favoarea unei astfel de blocări a spaţiilor intercelulare pentru trecerea de molecule proteice au fost aduse pentru celulele tubilor renali: secţiuni de rinichi de şoarece au fost examinate la microscopul electronic după injectarea intraperitoneală de hemoglobină bovină, iar pătrunderea hemoglobinei a putut fi urmărită printre celule la nivelul marginii ,,în perie'',

---

Fig. 5.6. Microelectronografii ale unor celule epiteliale din intestinul de şobolan.

În secţiunea de sus, longitudinală (mărire 23 000 x), se văd elemente ale reţelei terminale (*RT*) situate în imediata vecinătate a ,,marginii în perie'' (*MP*). La joncţiunea dintre două celule, membranele citoplasmatice alăturate se îndreaptă spre suprafaţă trecînd printr-un dezmozom (*D*) şi prin bara terminală (*BT*). Imaginea de jos (mărire 130 000 x) reprezintă o secţiune transversală prin ,,marginea în perie''. Se observă dispunerea strînsă, într-o aliniere de tip hexagonal, a microvilozităţilor (*MV*). Fiecare microvilozitate este înconjurată de o membrană în care se pot distinge două straturi osmiofile separate de un strat clar. Acesta este aspectul membranei citoplasmatice la o mărire mare, el fiind deosebit de evident în această situaţie, întrucît toate membranele care înconjură microvilozităţile sînt situate perpendicular faţă de planul secţiunii.

Scanned with OKEN Scanner

dar numai pînă în punctul din apropierea barei terminale unde membranele veneau în contact.

FAGOCITOZA ȘI PINOCITOZA

Fagocitoza și pinocitoza la ambe și la celulele în culturi, precum și aspectele acestor procese așa cum apar la microscopul optic au fost discutate în cap. 1. Pe microelectronografii se poate constata că foarte multe tipuri de celule, ca celulele musculare, nervoase, endoteliale, conțin mici vacuole limitate de o membrană ce are aspectul și grosimea asemănătoare cu cele ale membranei citoplasmatice. Uneori se poate vedea o invaginare a membranei citoplasmatice care pare să reprezinte sursa de formare a unei astfel de vacuole. Aceste vacuole sînt considerate ca vezicule de pinocitoză. Deși dinamica procesului nu poate fi examinată la microscopul electronic, diferite particule de substanțe electronopace, cum ar fi aurul coloidal, sulfura de mercur, fier-dextranul și feritina, pot fi găsite pe microelectronografii în interiorul acestor vezicule și par să pătrundă în celulă prin pinocitoză. Se pare că ar exista trei mecanisme de pinocitoză. În două dintre aceste tipuri, prima fază constă în aderarea particulei de suprafața celulară; apoi porțiunea suprafeței care poartă particula se invaginează formînd o veziculă pe marginea celulei (fig. 5.7*a*), sau, în al doilea tip, particula este transportată în celulă coborînd de-a lungul unui canal adînc din fundul căruia se separă un șirag de vezicule (fig. 5.7*b*). În cel de-al treilea tip de mecanism de pinocitoză are loc aderarea și fuzionarea proeminențelor ondulante ale membranei citoplasmatice, care includ astfel o parte din lichidul extracelular.

Compoziția mediului poate altera viteza procesului de pinocitoză, particulele încărcate negativ fiind, de exemplu, ingerate rapid; în primele două mecanisme intervine probabil o interacțiune specifică între moleculele aflate în soluție și suprafața celulară. Acest stadiu inițial de adeziune a moleculelor de suprafața celulară poate fi important pentru asigurarea unei absorbții selective, astfel încît vezicula, după ce s-a format, să conțină substanța respectivă într-o concentrație mai mare decît

Scanned with OKEN Scanner

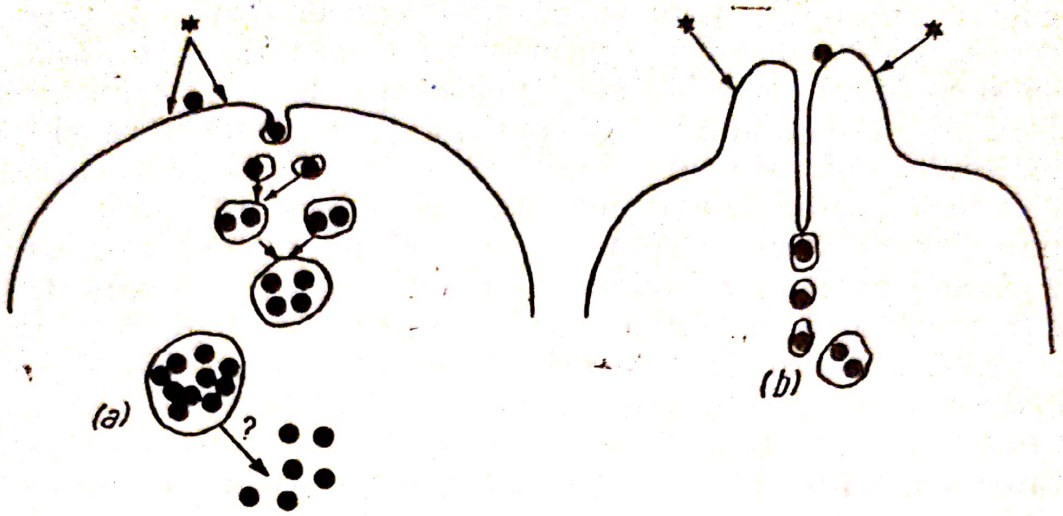


Fig. 5.7. Reprezentare schematică a mecanismului ipotetic al pinocitozei, pe baza datelor furnizate de microscopia electronică.

În ambele cazuri se presupune că primul stadiu constă în atașarea unei particule de suprafața celulei. Conform schemei (*a*), în punctele marcate printr-un asterisc ar avea loc apoi o sinteză sau revărsare de material membranos, ceea ce face ca particula să fie invaginată într-o veziculă de pinocitoză. Fuzionarea buzelor invaginației duce la formarea unei vezicule izolate. Fuzionarea acestei vezicule cu altele similare dă naștere unei vezicule mari de absorbție. Etapa finală ar putea consta în îndepărtarea enzimatică a membranei limitante, urmată de eliberarea în matricea citoplasmatică a substanțelor absorbite. O variantă ușor modificată a acestui proces este reprezentată în schema (*b*). În acest caz, sinteza sau revărsarea membranei în punctele marcate cu cîte un asterisc provoacă o invaginare tubulară a membranei prin care particulele atașate sînt transportate adînc în celulă. De la capătul acestui tub se detașează apoi vezicule.

mediul înconjurător. Atunci cînd micile vezicule formate în apropierea suprafeței înaintează spre centrul celulei, ele fuzionează, pierd o parte din lichid, iar concentrația de substanță absorbită ajunge astfel să fie mult mai mare în veziculele centrale. În cele din urmă, peretele veziculei poate să dispară, astfel încît materialul ingerat este liberat în masa citoplasmatică. Pe microelectronografii s-au văzut de asemenea vezicule mici ce par să provină prin înmugurire din veziculele mari aflate în citoplasmă. Dispariția unei vezicule, constatată la microscopul optic, ar putea deci să fie uneori urmarea unei parcelări a ei în vezicule prea mici pentru a mai putea fi vizibile la un astfel de microscop.

Proprietățile electrice ale membranei citoplasmatice, precum și cercetări directe de permeabilitate întreprinse cu izotopi radioactivi arată că această membrană este capabilă să dirijeze trecerea unor molecule sau ioni de dimensiunile ionilor de potasiu, care au un diametru de aproximativ 0,3 mμ. Cu toate acestea, cercetări microscopice în lumină ultravioletă efectuate cu mole-

cule de proteină marcate cu fluoresceină (cap. 1), precum şi cercetări de microscopie electronică efectuate cu feritină arată că şi molecule proteice mari pot pătrunde în interiorul celulei. Deşi am putea admite că permeabilitatea membranei pentru moleculele mici şi pentru ioni este reglată de anumite mecanisme chimice sau ţine de existenţa unor mici pori, este greu să ne reprezentăm o structură poroasă care să permită pătrunderea unei molecule proteice atingînd chiar 4 mμ şi care să aibă totodată o permeabilitate selectivă pentru ioni. În schimb, pinocitoza poate fi privită ca o modalitate prin care molecule mai mari sînt disociate din agregate şi împachetate de membrana citoplasmatică, fiind astfel trecute în interiorul celulei fără ca vreodată continuitatea acestei membrane să fie efectiv întreruptă. O dată aflat în citoplasmă, peretele veziculei poate fi distrus şi conţinutul ei încorporat fără vreo pierdere de substanţe citoplasmatice. Vom vedea mai jos că un fenomen invers pinocitozei este utilizat pentru a transporta substanţe specifice în afara celulei, cu o pierdere restrînsă de molecule mici, uşor difuzibile. Echipajul unui submarin scufundat scapă din el într-un mod destul de asemănător, cu ajutorul unui sistem de sasuri care permite fiecărui om să iasă afară fără ca în acelaşi timp interiorul submarinului să fie inundat. Datorită descoperirii faptului că pinocitoza este un fenomen atît de răspîndit, în viitor, la discutarea permeabilităţii trebuie să se deosebească o permeabilitate totală a întregii celule, în care se include atît pinocitoza, cît şi permeabilitatea propriu-zisă a membranei citoplasmatice.

MIELINA NERVILOR ŞI BASTONAŞELE ŞI CONURILE RETINIENE

Anumite structuri, cum sînt tecile ce înconjură celulele nervoase mielinizate, sînt formate printr-o invaginare amplă a membranelor citoplasmatice. Aceste structuri merită o atenţie specială, nu numai pentru că o astfel de specializare este neobişnuită şi legată de funcţia celulei, dar şi pentru că ele reprezintă mase abundente, dispuse regulat, de membrană citoplasmatică care pot fi examinate analitic prin metode fizice şi chimice. În capitolul următor vom discuta datele rezultate din aceste cercetări şi ne vom ocupa de structura moleculară a membranelor componente respective. Aici vom descrie numai morfolo-

Scanned with OKEN Scanner

gia tecii de mielină a nervului, precum și a bastonașelor și conurilor din retină, care reprezintă probabil alte exemple ale unei asemenea specializări.

Celulele nervoase aflate în cornul anterior al substanței cenușii din măduva spinării a unui mamifer mare au un diametru de aproximativ 80 μ. Axonii cilindrici ai acestor celule, care se întind în lungul membrului pentru a inerva un mușchi al piciorului, au un diametru de numai aproximativ 5 μ și sînt adeseori mai lungi de un metru. O mare parte din structura întregului nerv este menită să asigure acestor prelungiri subțiri rezistența fizică și izolarea electrică. Toți axonii sînt izolați de țesuturile înconjurătoare prin celule Schwann sau prin celule *gliale*. În nervii nemielinizați, mulți axoni sînt înfășurați într-o singură celulă Schwann (fig. 5.8 *a*). Zona în care buzele unei celule Schwann se întîlnesc în jurul unuia sau mai multor axoni este denumită mezaxon (din cauză că se aseamănă cu dispunerea peritoneului în jurul tubului intestinal cu formarea mezenterului). Acolo unde urmează să se formeze o teacă de mielină, într-o celulă Schwann este inclus doar un singur axon (fig. 5.8 *b*) iar în cursul dezvoltării mezaxonul se alungește și se încolăcește de mai multe ori în jurul axonului, formîndu-se o spirală (fig. 5.8 *c*). În stadiile precoce ale dezvoltării, această spirală este înfășurată lax, spirele succesive fiind separate între ele de citoplasma celulei Schwann. Mai tîrziu, se găsește o masă compactă de membrană citoplasmatică înfășurată în spirală, această structură spiralată fiind însăși teaca de mielină reprezentată în fig 5.8 *d*. Stratul extern al fiecărei spire a membranei citoplasmatice vine în contact cu un alt strat exterior al membranei din spira următoare; în mod similar vin în contact și straturile interne. Suprafețele interne alăturate dau naștere liniei dense principale, care se repetă în structura mielinei (*D* în fig. 5.8 *e*), în timp ce suprafețele externe apar ca o linie slab pronunțată, denumită linia intraperiodală (*I* în fig. 5.8 *e*). Tecile de mielină ale unui nerv mare pot atinge pînă la 2—3 μ grosime, numărul de spire necesar pentru a forma o astfel de teacă depășind 200. Mecanismul efectiv prin care se produce spiralarea mielinei nu este lămurit; ar putea fi vorba de o rotire a axonului ori s-ar putea ca la marginea celulei marcate cu un asterisc în fig. 5.8 *b* să pornească un proces de sinteză de membrană astfel

Scanned with OKEN Scanner

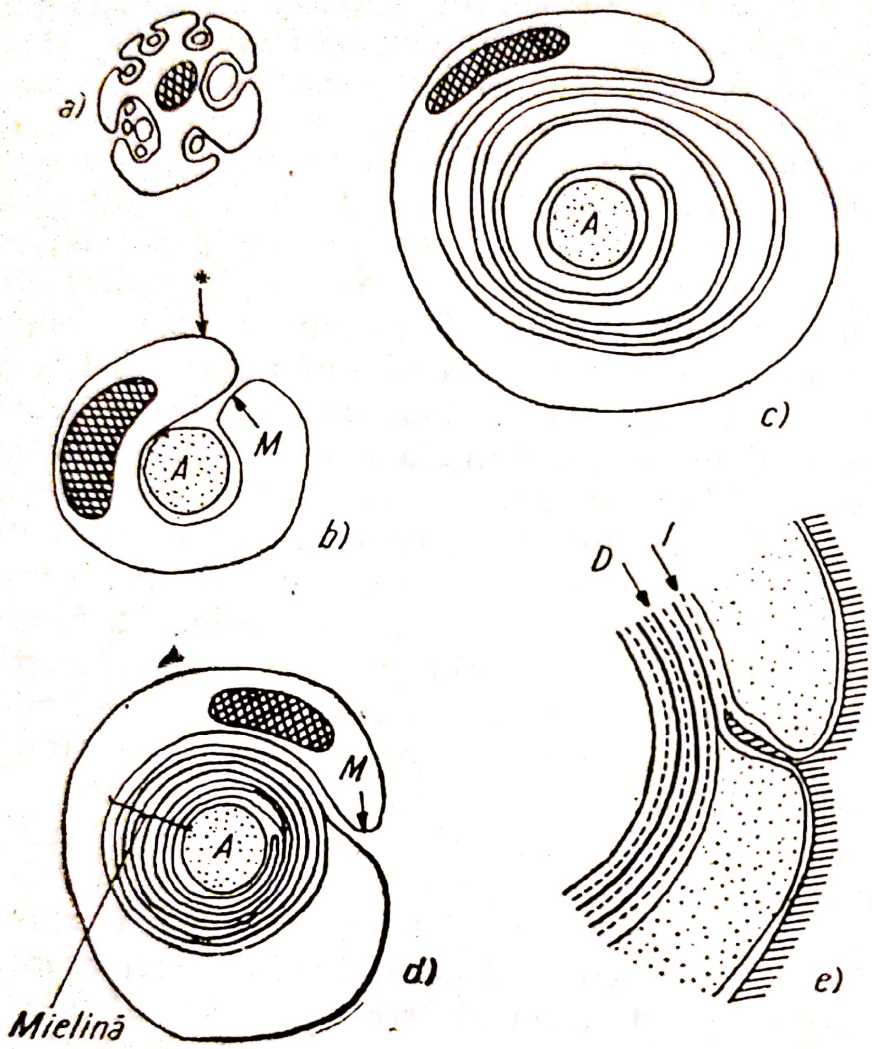


Fig. 5.8. Reprezentare schematică a formării tecii de mielină. În nervii mielinizați, într-o singură celulă Schwann sînt adeseori incluși numeroși axoni (*a*).

Această structură se întîlnește la nervii embrionari și, înainte de începerea mielinizării, celulele Schwann proliferează, ajungîndu-se ca în fiecare celulă Schwann să fie inclus cîte un singur axon (*A*), după cum se vede în (*b*). Membrana celulară invaginată dă naștere mezaxonului (*M*). Prima etapă a mielinizării constă în alungirea mezaxonului și în înfășurarea sa în spirală în jurul axonului (*c*). Apoi citoplasma dintre turele spiralei dispare, astfel încît se formează o masă spiralată compactă de material membranos. Aceasta este teaca de mielină reprezentată în (*d*). În schema (*e*) este figurat, la o putere de mărire mai mare, aspectul mezaxonului în mielina compactă. Acolo unde vin în contact suprafețele externe ale membranei citoplasmatice invaginate, se formează o linie delicată intraperiodală (*i*). În locul unde vin în contact suprafețele interne ale membranei citoplasmatice, se formează o linie întunecată, cunoscută sub numele de linie densă principală (*D*). Pe o secțiune prin mielina matură vor apărea deci o serie de linii alternative dense și intraperiodale, perioada ce se repetă de la o linie densă la cea următoare fiind constituită dintr-o pereche de membrane citoplasmatice de celulă Schwann.

Scanned with OKEN Scanner

încît mielina unei celule Schwann staţionare să se înfăşoare în jurul unui axon şi el staţionar. Date recente obţinute cu ajutorul culturilor celulare sugerează şi un alt mecanism, anume că însăşi celula Schwann ar fi cea care se roteşte.

Atunci cînd se izolează dintr-un nerv mielinizat un singur axon împreună cu teaca de mielină ce îl înconjură, aceasta — examinată printr-o lupă—apare divizată în segmente, fiecare dintre ele avînd o lungime de aproximativ 1,5 mm. Golurile dintre segmente sînt cunoscute sub denumirea de nodurile lui Ranvier. De regulă, în fiecare segment de mielină cuprins între două noduri există cîte un singur nucleu de celulă Schwann, astfel încît fiecare segment corespunde unei singure celule înfăşurate într-o spirală complexă (fig. 5.9).

La nivelul nodurilor există o interdigitare bogată între prelungirile celulelor Schwann alăturate, dar membranele lor citoplasmatice adiacente sînt separate prin spaţiul obişnuit de 15—20 mμ. Acesta este probabil spaţiul care, la nivelul nodurilor, formează canalele ce duc de la membrana axonului pînă la mediul lichid din jurul celulelor Schwann şi cărora li se atribuie un rol esenţial în cadrul teoriei conductibilităţii în salturi a impulsului nervos. Această teorie implică, de asemenea, necesitatea ca porţiunea de membrană axonală ce se întinde dedesubtul segmentelor internodale ale tecii de mielină să fie izolată electric de lichidul ce înconjură celulele Schwann. Imagini electronoptice au arătat într-adevăr că, în apropierea nodurilor, între axon şi membranele celulelor Schwann există un contact relativ intim care ar putea împiedica sau limita în mod considerabil în această regiune difuziunea ionică de-a lungul spaţiului dintre axon şi celula Schwann.

Un alt sistem complex de membrane intracelulare apare în celulele fotosensibile ale retinei. Aceste celule, cele cu conuri şi cele cu bastonaşe, au un segment intern care conţine nucleul şi joncţiunea sinaptică cu alte celule nervoase; după ce lumina a străbătut segmentele interne, ea pătrunde în segmentele externe care sînt inclavate între celulele pigmentare. Aceste segmente externe sînt pline de saci laminari care, judecînd după cercetări de microscopie electronică efectuate pe celule retiniene în dezvoltare, par să ia naştere prin invaginarea membranelor citoplasmatice. Ansamblul de saci, precum şi alte caracteristici ale bastonaşelor retiniene sînt prezentate în fig. 5.10.

Scanned with OKEN Scanner

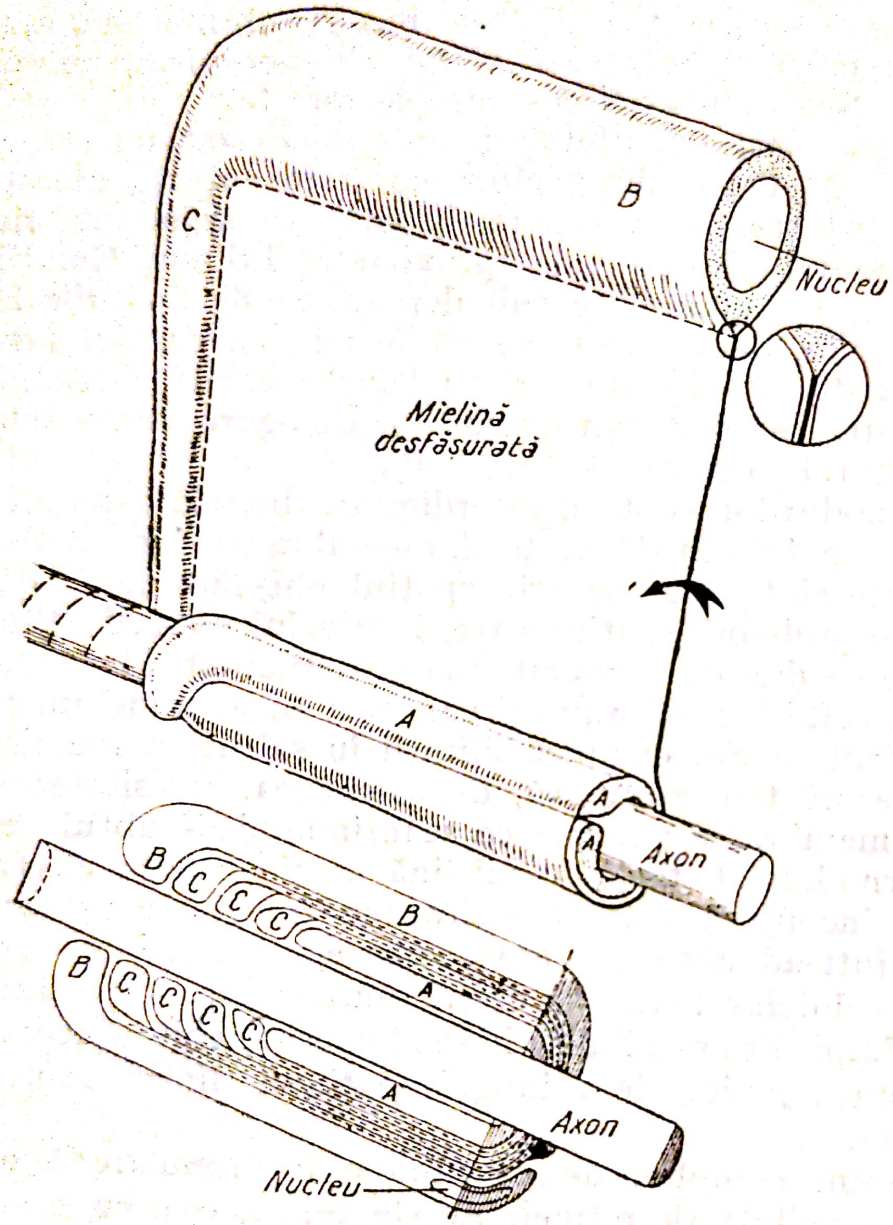


Fig. 5.9. Reprezentare schematică a structurii tridimensionale a unei celule Schwann înconjurînd un axon mielinizat.

În schema de sus este figurată o jumătate dintr-o celulă Schwann, cu capătul secționat privind spre dreapta și cu un nod Ranvier în stînga. Celula este redată ca și cum ar fi fost desfășurată prin ruperea contactului dintre turele spiralei de-a lungul liniei intraperiodale. Turele membranei citoplasmatice au rămas atașate unele de altele prin suprafețele lor citoplasmatice, unde formează linia densă principală (medalion). Partea externă a celulei Schwann (*B*) conține nucleul, iar partea internă (*A*) continuă să fie înfășurată în jurul axonului. Între citoplasma părților interne și externă există o continuitate, asigurată prin intermediul unui canal (*C*), aflat la fiecare capăt al celulei. Dacă celula este înfășurată în jurul axonului (schema de jos), acest canal ia o formă spiralată, astfel încît la secționare capătă aspectul unui șir de buzunare (*C*). La nivelul nodului Ranvier, capetele ambelor celule Schwann, situate de o parte și de cealaltă a nodului, dau naștere acestor canale spiralate. Prelungirile a două celule se întrepătrund, între membranele lor citoplasmatice alăturate rămînînd însă un spațiu de 15–20 mμ.

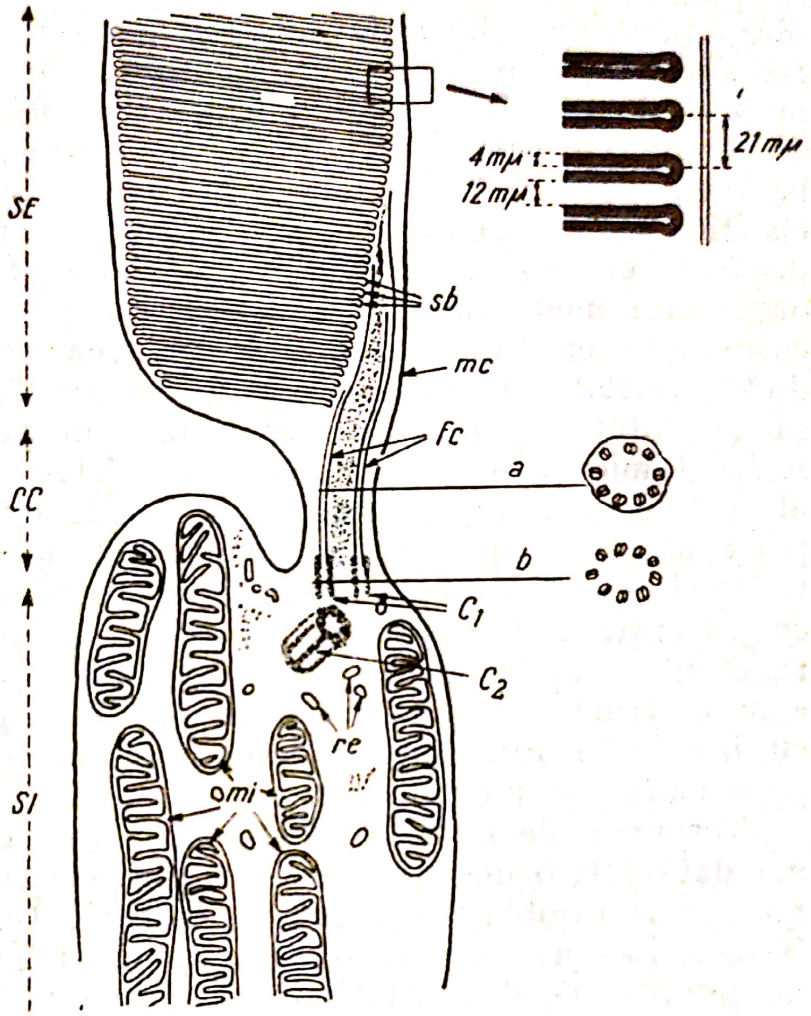


Fig. 5.10. Schemă bazată pe examinarea la microscopul electronic a celulelor cu bastonaş din retina de mamifere.

În partea stîngă sînt reprezentate: segmentul extern (*SE*), segmentul intern (*SI*) şi tulpina de legătură sau cilul (*CC*). Pe secţiuni transversale ale acestei tulpini (*a*, în partea dreaptă) se observă 9 perechi de filamente tipice de cili dispuşi circular, deşi în cilii normali există o pereche suplimentară de filamente aşezată central. Se pare de aceea că segmentul extern al celulelor cu bastonaş din retină reprezintă o variantă a dezvoltării normale a cililor. Schema redă de asemenea aspectul electronoptic al centriolilor (C_1, C_2 şi secţiunea transversală *b* din dreapta). Centriolii, care în celulele aflate în curs de diviziune au rolul unor centri pentru formarea asterului (cap. 1), pot îndeplini după cîte se pare şi rolul de centri de creştere ai filamentelor ciliare (*fc*). Alte elemente figurate în această schemă sînt sacii bastonaşelor (*sb*) şi dimensiunile lor (dreapta sus), membrana citoplasmatică (*mc*), mitocondriile (*mi*) şi elementele tubulare ale reticulului endoplasmic (*re*). Examinarea electronoptică a unor bastonaşe retiniene în curs de dezvoltare sugerează că sacii bastonaşelor sînt formaţi prin invaginarea membranei citoplasmatice (după De Robertis, 1960).

Scanned with OKEN Scanner

Încă din primele perioade ale istoriei microscopiei electronice a devenit evident faptul că organitele celulare, cum ar fi mitocondriile, au o structură membranoasă complexă; mai mult decît atît, între aceste organite au fost găsite o puzderie de canale, vezicule şi saci laminari a căror existenţă nu fusese bănuită anterior. Aceste observaţii ridică o serie de probleme de clasificare. Mitocondriile pot fi grupate într-o clasă aparte, deoarece ele pot fi izolate prin centrifugare diferenţială, au o organizare membranoasă caracteristică şi există puţine indicii care să sugereze că membranele lor ar avea vreo legătură cu oricare dintre celelalte membrane găsite în celulă. Mitocondriile par să fie unităţi separate, atît din punct de vedere structural, cît şi biochimic. Unii autori clasifică celelalte membrane interne ale celulei prin raportarea lor la zonele citoplasmatice care se pot evidenţia prin microscopia optică clasică, cum ar fi regiunea Golgi şi ergastoplasma; alţii privesc toate membranele interne, cu excepţia mitocondriilor, ca părţi ale unui sistem comun, reticulul endoplasmic. Alţi autori preferă să evite riscul de a acorda structurilor membranoase, în mod prematur, denumiri cu implicaţii funcţionale, desemnîndu-le prin prefixe greceşti pe o bază pur morfologică.

Termenul de *reticul endoplasmic* a fost introdus pentru prima dată într-o descriere a aspectului electronoptic al citoplasmei unor fibroblaşti crescuţi în cultură. În aceste celule, membranele interne formează o reţea a cărei întindere se limitează la endoplasmă, dar în ultimii ani termenul de „reticul endoplasmic" a fost utilizat, uitîndu-se originea sa, ca o denumire generală pentru elemente asemănătoare existente practic în toate celulele. Vom adopta această formulă şi vom reuni în aceeaşi descriere atît reticulul purtător de ribozomi (vezi mai jos), cunoscut sub denumirea de reticul endoplasmic cu suprafaţă rugoasă, cît şi reticulul endoplasmic neted, care cuprinde un mare număr de vezicule, tuburi şi saci turtiţi, răspîndiţi în întreaga celulă. Un mod particular de dispunere a reticulului endoplasmic neted se întîlneşte în apropierea nucleului; aici, sacii turtiţi sînt înghesuiţi unul peste celălalt şi sînt înconjuraţi de mici vezicule şi de picături de lipide. Acesta este aspectul electronoptic al „aparatului" Golgi. Evidenţierea unei astfel de regiuni organizate a celulei, aşa-numita *regiune Golgi*, a întărit convingerea

Scanned with OKEN Scanner

că aparatul Golgi nu este exclusiv un artefact, deşi deocamdată se ştie încă puţin despre funcţia sau compoziţia chimică a acestei regiuni.

În multe texte de histologie curente se găsesc relatări despre dispoziţia membranelor într-o celulă „tip"; ar trebui precizat însă că o astfel de celulă nu există. Orice aranjament dat al membranelor nu este decît expresia morfologică a unei activităţi particulare a unui anumit tip de celulă şi variază continuu în decursul desfăşurării acestei activităţi; pentru o funcţie diferită, membranele se dispun într-un mod cu totul diferit. O celulă tip este analogă cu schema unui vertebrat tip; ea este utilă, dar nu dă nici o indicaţie asupra adaptărilor caracteristice mamiferelor, păsărilor şi peştilor. După cum vom vedea în paragrafele următoare, în diferite tipuri de celule există variaţii considerabile în dispunerea membranelor. Unii autori consideră că diferitele componente ale reticulului endoplasmic sînt unităţi separate, în timp ce alţii admit că toate membranele sînt legate între ele sau derivă unele din altele. Această controversă este consecinţa imposibilităţii de a examina la microscopul electronic mişcarea şi interrelaţiile diferitelor grupuri de formaţii intracelulare, precum şi a faptului că, utilizînd secţiuni groase de 20 mμ, ar fi nevoie de aproximativ 500 de secţiuni seriale pentru a reconstitui membranele unei singure celule aşa cum se prezintă ele la un moment dat. Astfel dacă, întîmplător, într-o secţiune două membrane apar în continuitate, nu poate fi precizat dacă este vorba despre o continuitate trecătoare sau dacă aceasta există în permanenţă şi am nimerit exact peste un plan de secţiune fericit ales. Vom vedea mai tîrziu ce modificări profunde ale morfologiei membranelor interne ale celulei pancreatice apar în cursul unei operaţii de omogenizare. Acest tratament este, fără îndoială, brutal, dar nu putem exclude eventualitatea ca anumite remanieri minore ale modului normal de dispunere a membranelor să apară şi într-un material altminteri perfect fixat şi preparat.

Asupra acestei probleme a interconexiunilor dintre diferitele sisteme membranoase nu poate fi trasă nici o concluzie şi este mai înţelept, pentru moment, să discutăm separat dispoziţia şi aparenta semnificaţie funcţională a membranelor interne din diferite tipuri de celule, decît să facem generalizări asupra dispunerii lor într-o celulă „ideală". Vom descrie mai întîi mito-

Scanned with OKEN Scanner

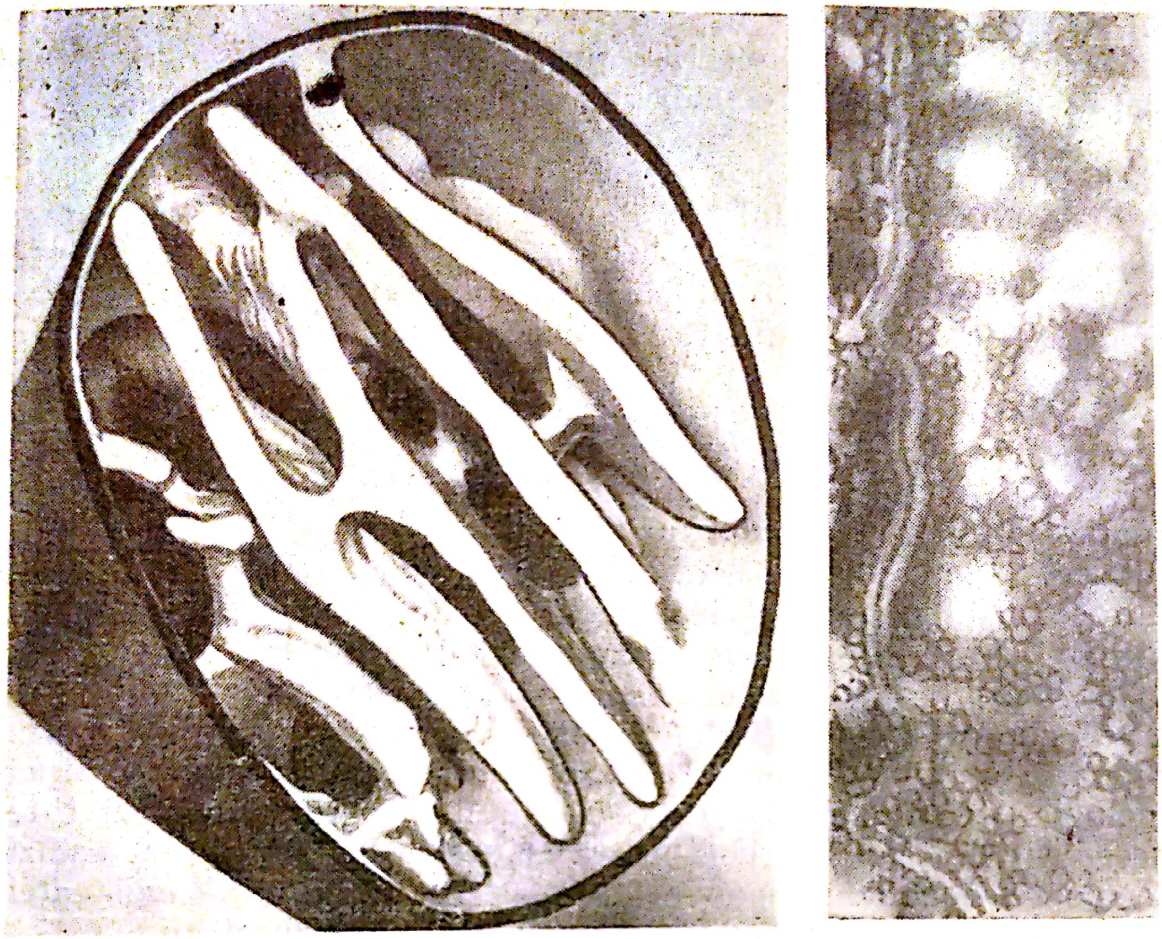
condriile, apoi modificările membranelor interne în cursul ciclului secretor al unei celule proteino-secretoare, precum şi în cursul unei diviziuni celulare, iar în cele din urmă, ca un tablou contrastant, vom analiza dispoziţia membranelor în ţesutul muscular contractil.

MITOCONDRIILE

Orice activitate celulară necesită energie, care este obţinută în mod obişnuit prin oxidarea treptată a unor substanţe bogate în energie, cum sînt glucoza sau acizii graşi. Observaţii mai vechi au arătat că mitocondriile ar putea interveni în oxidările celulare, iar cercetările mai recente discutate în cap. 2 au confirmat faptul că aceste organite joacă un rol direct, şi poate chiar exclusiv, în anumite etape ale acestor procese. Dintre toate celulele, numai globulele roşii mature, care nu necesită foarte multă energie internă, precum şi bacteriile sînt lipsite de mitocondrii. Forma, mărimea şi numărul mitocondriilor variază mult în diferitele celule; de obicei, ele sînt formaţii lungi şi subţiri — de unde şi numele lor —, dar pot avea şi forma unor bastonaşe scurte şi groase sau a unor globule sferice. Mitocondriile au fost observate iniţial la microscopul optic prin afinitatea lor pentru colorantul Verde Janus, dar abia evidenţierea pe microelectronografii a structurii specifice a membranei lor interne a oferit un criteriu valabil pentru identificarea mitocondriilor şi a arătat marea lor răspîndire.

În secţiuni fine ale unor preparate fixate fie cu tetraoxid de osmiu, fie cu permanganat, fiecare mitocondrie prezintă un înveliş extern gros de 4—6 mμ (vezi mitcondria *M* în fig. 5.2). Acesta este despărţit de o membrană internă similară printr-un spaţiu transparent de aproximativ 10 mμ. Compartimentul central al mitocondriei, învelit în membrana internă, este umplut cu o matrice în care se găsesc mici granule. Membrana internă proemineză în masa matricei sub formă de cute sau tuburi, formînd aşa-numitele *creste*, fiecare dintre acestea prezentîndu-se pe o secţiune fină ca o pereche de membrane interne separate între ele printr-un spaţiu de aproximativ 10 mμ. Prin secţionare serială şi reconstituire se poate obţine structura tridimensională a unei mitocondrii (fig. 5.11). Adesea cuta de membrană care

Scanned with OKEN Scanner



a) b)

Fig. 5.11. *a*) Fotografie a unui model reprezentînd structura tridimensională a unei mitocondrii (mărire 260 000 x).

Acest model a fost realizat cu ajutorul unor secţiuni în serie ale unei mitocondrii aflate într-un axon la nivelul joncţiunii neuromusculare. O membrană externă învelește întregul organit. O membrană internă este dispusă paralel cu membrana externă şi proemineză totodată în compartimentul central sub forma unor cute sau creste. Aceste creste sînt neregulate şi anastomozate între ele. În stare vie, spaţiile dintre creste ar fi ocupate de matricea mitocondrială (după Andersen-Cedergren, 1959).

b) Detalii de structură ale crestelor unor fragmente mitocondriale, evidenţiate prin tehnica contrastului negativ (mărire 140 000 x).

Particule cu diametrul de 8—9 mμ ataşate de tije lungi de 4—5 mμ sînt dispuse de-a lungul marginii membranelor crestelor şi al membranei interne a învelişului mitocondriei, de partea care priveşte către matricea mitocondrială (după Stoeckenius, 1963).

formează o creastă nu se continuă cu membrana internă de la periferia mitocondriei decît într-o zonă restrînsă, în aşa fel încît de-a lungul celei mai mari părţi a circumferinţei crestei, care are forma unui disc turtit, aceasta se învecinează strîns cu membrana internă fără a fi însă unită cu ea. Crestele nu

Scanned with OKEN Scanner

formează despărţituri complete, aşa încît există posibilitatea unei circulaţii, pe căi ocolite, prin întreaga matrice, de la un capăt la altul al mitocondriei.

Structura internă a mitocondriei, ca şi forma şi mărimea întregului organit variază în anumită măsură în diferitele ţesuturi. Mitocondriile celulelor animale din stadiile embrionare precoce, ca şi ale celulelor vegetale, conţin numai puţine creste scurte, în timp ce în celulele corticalei suprarenale locul crestelor este luat de invaginaţii tubulare, aspect întîlnit de asemenea în epiteliul branhial al peştilor. În celulele musculare (fig.5.18) se găsesc creste turtite; aici, matricea este redusă şi întreg interiorul mitocondriei este umplut cu creste strîns înghesuite. Aceste variaţii sînt numai de natură superficială; structura fundamentală cuprinzînd un înveliş extern şi o membrană internă bogat plisată este constantă, iar identificarea unei mitocondrii pe o microelectronografie nu dă naştere niciodată la confuzii. După omogenizarea unui ţesut şi centrifugarea omogenatului, structura mitocondriilor se păstrează iar sedimentul care le conţine poate fi identificat şi puritatea sa verificată prin prepararea din el a unor secţiuni fine fixate în osmiu şi apoi incluzionate (fig. 5.12). În cap. 2 am amintit modul în care această tehnică a fost combinată cu studii biochimice iar astăzi se poate conchide cu oarecare certitudine asupra existenţei unei relaţii între mitocondrii şi unele enzime respiratorii.

Anumite celule specializate au necesităţi energetice mari. Celulele musculare constituie un exemplu tipic în acest sens, iar secreţia unei substanţe împotriva unui gradient osmotic este la fel de pretenţioasă; glandele nazale ale raţei secretă o soluţie salină concentrată, celulele acido-secretoare ale stomacului elaborează o soluţie 0,1 N de HCl iar celulele tubilor renali produc o creştere importantă a concentraţiei filtratului glomerular. În toate aceste celule, o mare parte din citoplasmă este ocupată de mitocondrii, iar fiecare dintre acestea prezintă o abundenţă de cute ale membranei interne mai mare decît cea întîlnită în mitocondriile mai puţin numeroase din alte celule glandulare, nervoase sau vegetale. Cercetările asupra structurii mitocondriilor arată că există un raport între consumul de energie al unei celule şi suprafaţa totală a membranei mitocondriale.

Pornindu-se de la anumite probe neconvingătoare, s-a răs-

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 5.12. Microelectronografie (fixare cu osmiu, secţiune fină) a unor mitocondrii din cord, izolate în zaharoză 0,88 M, condiţii care asigură păstrarea unei activităţi biochimice optime şi obţinerea unui aspect electronoptic foarte asemănător cu cel al mitocondriilor din secţiuni fine de miocard fixat cu osmiu (mărire 60 000 x) (după Ziegler şi colab., 1958).

pîndit ideea că mitocondriile ar putea da naştere unor structuri din cele mai variate, cum ar fi : picături de grăsime, miofibrile, produse de secreţie şi granule de pigment ; aceste supoziţii nu au fost însă confirmate. Originea mitocondriilor rămîne obscură ; ele ar putea proveni din diviziunea unor mitocondrii existente,

Scanned with OKEN Scanner

iar examinarea la microscopul cu contrast de fază a unor celule vii permite uneori să se vadă segmentarea unor mitocondrii lungi în astfel de numeroase organite scurte. Pe microelectronografii, care dau imagini statice, apariţia ocazională a unui sept transversal a fost interpretată ca reprezentînd un stadiu precoce al acestei segmentări, deşi ar putea fi vorba numai de o buclă formată de organit, văzută în condiţiile unei secţiuni ce trece de-a lungul unei creste. Pare puţin probabil ca mitocondriile să se dezvolte din alte structuri membranoase, cum ar fi membrana citoplasmatică sau reticulul endoplasmic, întrucît nu s-a demonstrat în mod convingător existenţa unor interconexiuni între ele.

RETICULUL ENDOPLASMIC ÎNTR-O CELULĂ PROTEINO-SECRETOARE

Există astăzi date numeroase (cap. 12) care arată că procesul de asamblare a aminoacizilor ce duce la formarea unei proteine este asociat într-un mod oarecare cu anumite particule citoplasmatice care conţin acid ribonucleic. Aceste particule, cunoscute sub denumirea de *ribozomi*, pot fi văzute pe secţiuni fine sub forma unor formaţii opace la fasciculele de electroni cu un diametru de 15 mμ. Ei pot fi, de asemenea, identificaţi în omogenatele tisulare, care au permis punerea în evidenţă a faptului că ribozomii conţin acid ribonucleic. Partea cea mai mare, dacă nu chiar totalitatea proceselor de sinteză proteică ce au loc într-o celulă, se petrece la nivelul acestor ribozomi. Proteinele astfel formate se împart în două grupe: cele necesare în compoziţia internă a celulei şi cele sintetizate pentru a fi exportate în mediul înconjurător.

Miofibrilele din muşchi şi hemoglobina din globulele roşii reprezintă exemple tipice pentru primul grup, dar de altfel toate celulele au nevoie de proteine noi în cursul creşterii şi diviziunii şi îşi resintetizează enzimele şi alte proteine pe măsura degradării lor continue (cap. 2). Într-adevăr, ribozomii se găsesc în citoplasma tuturor celulelor, cu excepţia globulului roşu matur. O celulă deplin dezvoltată dintr-un organism matur poate conţine relativ puţini ribozomi, dar celulele care se pregătesc pentru diviziune sau levurile şi bacteriile aflate în cursul fazei de creştere logaritmică conţin un număr mare de ribozomi

Scanned with OKEN Scanner

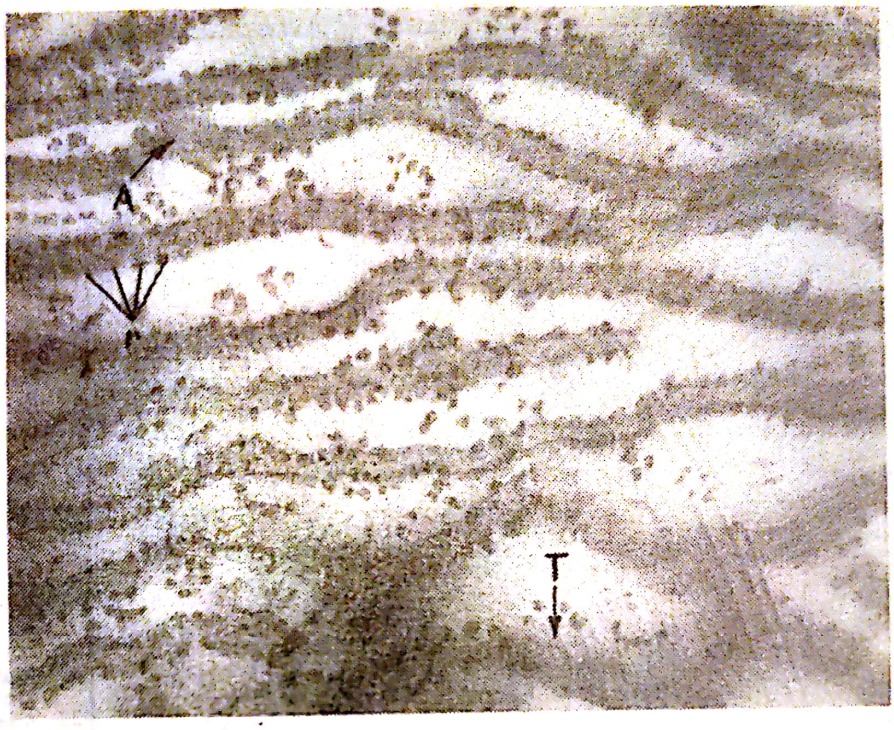


Fig. 5.13. Microelectronografie a unei porțiuni dintr-o celulă hepatică de șoarece (mărire 70 000 x).

Se pot vedea sacii turtiți aparținînd reticulului endoplasmic, cu ribozomii (*r*) atașați de suprafața externă a membranelor. Se observă o anastomoză între doi saci ai acestui reticul cu suprafață rugoasă (*A*), precum și tranziția spre reticulul cu suprafață netedă (*T*).

răspîndiți în citoplasmă. În celulele de acest tip există puține membrane intracitoplasmatice.

Producerea de proteină pentru export pare, dimpotrivă, să fie asociată cu o așezare caracteristică a ribozomilor la nivelul suprafeței externe a unui sistem complex de saci membranoși turtiți; totalitatea acestora formează ergastoplasma sau reticulul endoplasmic cu suprafața rugoasă (fig. 5.13). Exemple ale unei astfel de organizări se întîlnesc în plasmocitul care fabrică anticorpi, în fibroblastul care produce colagen, în celula pancreatică ce secretă enzime digestive și în celula hepatică ce formează proteinele plasmei. Sacii membranoși comunică unii cu alții, alcătuind o rețea continuă tridimensională care este înconjurată de matricea citoplasmatică. Interiorul celulei este astfel împărțit în două faze distincte, una înăuntrul iar cealaltă în afara membranelor reticulare endoplasmice. Nu toți ribozomii dintr-o astfel de celulă sînt legați de suprafața reticulului endoplasmic, dar trebuie reamintit că chiar și o celulă specializată pentru secreția de proteină participă în același timp la menținerea propriei sale integrități. Se poate presupune că numărul mic de ribozomi găsiți în matricea citoplasmatică servește acestui scop. În alte celule, cum ar fi celulele hepatice care produc

Scanned with OKEN Scanner

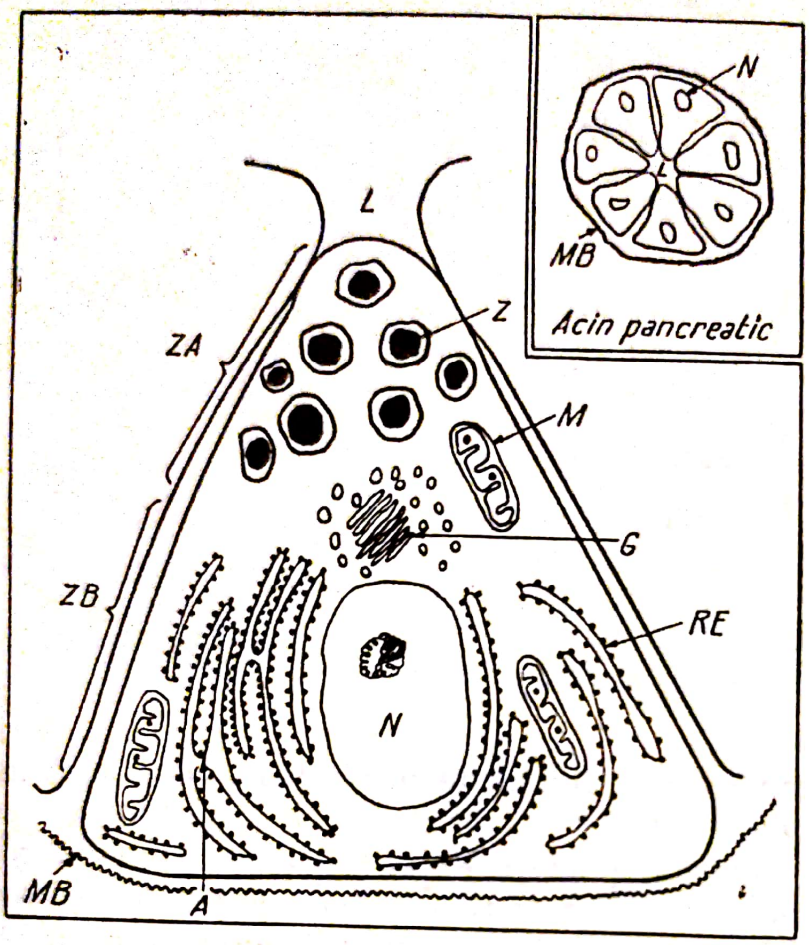


Fig. 5.14. Reprezentare schematică a structurii fine a unei celule pancreatice exocrine în repaus.

În medalion, o schiță ilustrînd dispunerea acestor celule secretorii de formă piramidală în jurul lumenului (*L*) acinului pancreatic. Zona apicală (*ZA*) a fiecărei celule conține granule de zimogen (*Z*), înconjurate de membrane netede. Nucleul (*N*) conținînd un nucleol ocupă centrul zonei bazale (*ZB*)iar sacii membranoși și veziculele aflate în vecinătatea nucleului, către polul apical al celulei, alcătuiesc zona Golgi (*G*). Citoplasma zonei bazale conține un bogat sistem de saci laminari paraleli care formează reticulul endoplasmic (*RE*). Pe suprafețele externe ale membranelor ce formează reticulul endoplasmic se găsesc numeroase granule mici, dense — ribozomii. Cavitățile reticulului endoplasmic comunică unele cu altele prin anastomoze (A). Mitocondriile (*M*) sînt răspîndite în toată citoplasma. Întregul acin este înconjurat de o membrană bazală(*HB*).

proteină pentru export, dar au și o activitate metabolică foarte intensă, se pare că aproximativ jumătate din numărul ribozomilor lor sînt liberi iar jumătate sînt legați de membrane.

Posibilitatea ca în sinteza proteinelor să intervină și membranele intracitoplasmatice nu poate fi deocamdată exclusă. Dacă însă sinteza efectivă este o proprietate a ribozomilor, atunci ce rol poate fi atribuit sistemului complex de membrane intracitoplasmatice existent în celulele proteino-secretoare? Această problemă a fost luată în studiu, alegîndu-se celule ale căror produse sînt identificabile și în care ciclul secretor poate fi pus sub controlul experimentatorului. Celulele exocrine ale pancreasului de cobai răspund acestor criterii, deoarece ele încep să secrete dacă animalelor li se administrează hrană după o perioadă de post. Uniformitatea relativă a pancreasului permi-

Scanned with OKEN Scanner

te ca datele obţinute prin analizarea chimică a unor omogenate de glandă să fie coroborate cu aspectele structurii fine a celulelor glandulare.

În fig. 5.14 este prezentată o celulă pancreatică în repaus. Ea are o formă piramidală, vîrful ei priveşte spre lumenul glandei iar zona bazală, mai largă, conţine nucleul. Reticulul endoplasmic cu suprafaţa rugoasă este restrîns în special la această zonă bazală, unde sacii membranoşi comunicanţi poartă pe suprafeţele lor externe ribozomi, întreaga reţea fiind inclusă în matricea citoplasmatică ce conţine mitocondrii şi ribozomi liberi. În zona apicală se găsesc o serie de corpi sferici denşi, înconjuraţi de o zonă clară, fiecare fiind conţinut într-o membrană netedă ; aceşti corpi sînt granulele de zimogen vizibile la microscopul optic. În sfîrşit, în această descriere simplificată distingem o regiune situată între nucleu şi zona apicală, care conţine vezicule aparent goale, precum şi îngrămădiri de saci turtiţi, toate aceste structuri fiind prevăzute cu membrane limitante de care nu sînt legaţi ribozomi : aceasta este regiunea Golgi.

Dacă un asemenea pancreas în repaus este omogenizat şi centrifugat, se obţin cinci fracţiuni (a se compara cu descrierea fracţiunilor obţinute din celulele hepatice, cap. 2). Aceste fracţiuni pot fi incluzionate şi secţionate în vederea examinării la microscopul electronic, iar structura lor poate fi comparată cu morfologia celulei intacte. Cantităţile relativ mari de material ce se obţin prin această metodă permit efectuarea de analize chimice cu fiecare fracţiune în parte şi corelarea rezultatelor cu organitele citoplasmatice respective. Se constată că fracţiunea microzomală este compusă predominant din mici vezicule sferice, denumite *microzomi*, ce provin din reticulul endoplasmic cu suprafaţa rugoasă. Sacii alungiţi şi turtiţi care formau iniţial o reţea completă s-au scindat, ducînd la formarea de vezicule separate. Acest lucru ilustrează labilitatea membranelor intracelulare ; dacă sînt rupte, capetele lor libere se unesc. Termenul de microzom este util, de exemplu, în cadrul unei discuţii asupra activităţii biochimice a acestor vezicule, dar trebuie să fie clar înţeles că în celula vie materialul microzomal nu se află fragmentat în acest mod.

Dacă fracţiunea microzomală este tratată cu o soluţie slabă de săruri biliare, ribozomii sînt puşi în libertate de pe micro-

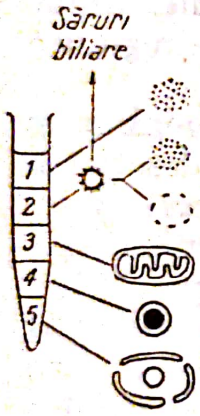
Scanned with OKEN Scanner

zomi și se obțin două subfracțiuni, una fiind reprezentată de resturile de membrană veziculară împreună cu conținuturile veziculelor, cealaltă reprezentînd ribozomi izolați. Datele cuprinse în tabelul 5.1 arată cum, chiar în condițiile contaminărilor

TABELUL 5.1.

Compoziția fracțiunilor obținute prin centrifugare din pancreasul de cobai în stadiu de repaus

Supernatantul obținut prin această fracționare continuă să conțină ribozomi, preparatul fiind supus centrifugării la 100 000 g doar pentru o perioadă de timp relativ scurtă. Prin centrifugări mai prelungite la 100 000 g, fracționarea poate fi împinsă mai departe, obținîndu-se separarea ribozomilor liberi de componentele cu greutate moleculară mai mică (cap. 12):



	Proteină		ARN		Ribonuclează		Enzime proteolitice	
	mg/g	%	mg/g	%	Activitate enzimatică/g	%	Activitate enzimatică/g	%
Supernatant	43,3	31	2,65	36	1010	30	63,5	8
Fr. microzomală a)	1,6	1	0,85	12	630	19	86,5	12
Fr. microzomală b)	18,9	13	0,95	13				
Fr. mitocondrială	75,9	55	2,85	39	550	16	135,0	18
Zimogen					1180	35	273,5	36
Fr. nucleară					250	8	196,5	26
Homogenatul complet	139,7	100	7,3	100	3350	100	113,9	(15)
Suma fracțiunilor individuale					3620	108	755,0	100

(Alcătuit pe baza datelor publicate de **G. E. PALADE** în *Electron Microscopy in Anatomy*, editat de J. D. Boyd, F. R. Johnson și J. D. Lever, Arnold, Londra, 1961.

inevitabile dintre fracțiuni, 61% din ARN se regăsește în supernatant și în fracțiunea microzomală. Ribozomii legați de microzomi cuprind 12% din ARN, dar numai 1% din totalul proteinelor. Concentrația maximă a activității proteolitice se regăsește în fracțiunea de zimogen, iar activitatea ribonucleazică se regăsește mai uniform împărțită între lichidul supernatant și granulele de zimogen.

Scanned with OKEN Scanner

Ţinerea la post timp de 48 de ore provoacă de modificări reduse ale structurii glandei aflate în stare de repaus, observîndu-se doar o creştere a mărimii şi numărului granulelor apicale de zimogen. Postul aduce în schimb toate celulele glandulare în acelaşi stadiu funcţional, iar la o oră după prima administrare de hrană consecutivă postului se pot observa o serie de modificări semnificative într-o mare proporţie a celulelor. Acum, cavităţile reticulare endoplasmice din zona bazală nu mai sînt atît de regulat aranjate; ele sînt destinse şi conţin mici granule (granule intracisternale), similare în privinţa compoziţiei şi structurii cu granulele de zimogen. În cursul celei de a doua ore după hrănirea animalului, aceste granule dispar din reticulul endoplasmic al zonei bazale, apărînd în schimb în veziculele cu membrană netedă din regiunea Golgi. La sfîrşitul celei de a doua ore, unele din granulele de zimogen din zona apicală pot fi văzute în imediata apropiere a suprafeţei celulei, membrana lor limitantă fiind în continuitate cu membrana citoplasmatică, aspect ce se datoreşte probabil descărcării conţinutului granulelor de zimogen în lumenul glandei.

Întreaga serie de imagini ar putea fi interpretată în termenii secvenţelor secretorii reprezentate în fig. 5.15. Această interpretare este sprijinită în oarecare măsură şi de constatarea ocazională a unei continuităţi între sacii membranoşi cu suprafeţe rugoase şi respectiv netede, dar argumentele cele mai consistente derivă din analizarea fracţiunilor celulare obţinute în diverse momente ale unui ciclu secretor sincronizat. Activităţile proteolitică şi ribonucleazică ale fracţiunii microzomale sînt de două ori mai mari în pancreasul examinat la o oră după hrănire decît la animalul aflat la post. Dacă microzomii sînt dezintegraţi cu ajutorul sărurilor biliare, în suspensia rezultată, aşa cum este de aşteptat, activitatea enzimatică se intensifică; ea constă predominant din granule intracisternale izolate. Pe de altă parte însă, s-a observat că ribozomii izolaţi au o activitate proteolitică practic egală cu cea a granulelor intracisternale. Acest fapt ar putea fi pur şi simplu consecinţa unei contaminări a fracţiunii ribozomale, dar el ar putea avea la bază şi evidenţierea proteinei nou formate la locul sintetizării ei, înainte ca ea să fi trecut în cavitatea reticulului endoplasmic. Marcarea rezervei intracelulare de aminoacizi cu leucină-^{14}C a sprijinit această din urmă interpretare, deoarece după intervale mai scurte de

Scanned with OKEN Scanner

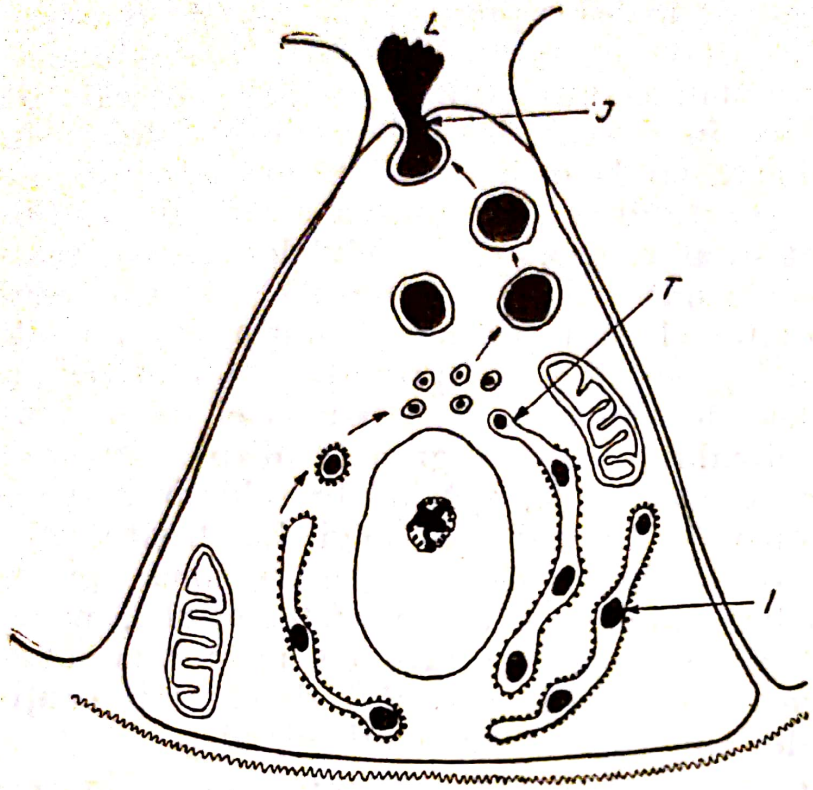


Fig. 5.15. Reprezentare schematică a mecanismului posibil de secreţie al celulei pancreatice exocrine.

În cursul secreţiei, membranele care limitează granulele de zimogen fuzionează cu membrana de suprafaţă (*J*), liberînd astfel conţinutul lor în lumenul acinului (*L*). În cavităţile reticulului endoplasmic pot fi observate granule mai mici de zimogen (granule intracisternale *I*). S-au observat de asemenea tranziţii (*T*) între membranele reticulului endoplasmic încărcate cu ribozomi şi membranele cu suprafaţă netedă din zona Golgi. (Pentru amănunte asupra acestui proces de secreţie, vezi text).

zece minute de la injectarea leucinei marcate, radioactivitatea maximă este găsită în ribozomi, ea fiind urmată, după un timp, de identificarea izotopului în granulele intracisternale şi apoi în cele de zimogen.

Pentru explicarea deplasării, de-a curmezişul întregii celule pancreatice, a produsului sintetizat, se pot imagina o diversitate de mecanisme posibile (fig. 5.15). Granula intracisternală, închisă într-o membrană, ar putea să părăsească reticulul endoplasmic lamelar prin efracţie, să se desprindă de ribozomii legaţi şi să migreze în regiunea Golgi pentru a forma aici micile vezicule netede găsite deasupra nucleului, pentru ca în cele din urmă aceste vezicule să fuzioneze, dînd naştere granulelor de zimogen. O altă alternativă ar consta în aceea că reticulul endoplasmic rămîne intact şi că produsele pe care le conţine migrează de-a lungul cavităţilor sale în regiunea Golgi, trecînd prin punţile de legătură observate între membranele cu suprafaţă rugoasă şi, respectiv, netedă.

Este posibil ca desprinderea produselor finale — enzimele pancreatice — să fie o condiţie necesară pentru a permite

Scanned with OKEN Scanner

continuarea sintezei lor, după cum separarea ar putea fi pur și simplu un mijloc de a permite regiunilor bazale ale celulei să-și exercite activitatea sintetică în ciuda faptului că pentru descărcarea produsului în lumenul glandei celula nu dispune decît de o zonă limitată a suprafeței ei apicale. S-ar putea, de asemenea, ca separarea în mici vezicule să fie un mecanism de eliminare din citoplasma celulară a anumitor substanțe, în așa fel încît cu prilejul fuzionării veziculelor cu membrana citoplasmatică să nu se piardă și alți constituenți ai citoplasmei.

Aceste cercetări sugerează cu tărie că membranele celulare interne ale celulelor de acest tip sînt implicate în separarea, transportul și evacuarea unui produs final, sinteza sa efectivă fiind o funcție a ribozomilor.

Există unele indicii că liberarea de acetilcolină la extremitățile nervului se produce printr-un proces similar de fuzionare a unor vezicule cu membrana citoplasmatică. Mai exact, aceste date (rezultate din cercetări de fiziologie asupra potențialului de membrană al celulei musculare la nivelul joncțiunii neuromusculare) arată că acetilcolina este eliberată în „pachete", iar pe microelectronografii poate fi văzut un mare număr de vezicule în citoplasma axonului din apropierea joncțiunii terminale sinaptice sau neuromusculare. Nu există totuși dovezi directe care să ateste că aceste vezicule conțin acetilcolină. Într-un mod aparent similar este eliminat și mucusul din celulele cupuliforme și această fuziune a unor vezicule cu membrana citoplasmatică, fenomen invers celui de pinocitoză, reprezintă poate un mecanism fundamental al excreției celulare. Celulele endoteliale din pereții capilarelor conțin vezicule, din care unele par să fuzioneze cu membranele citoplasmatice la nivelul uneia sau celeilalte din fețele celulei. Cercetările la microscopul electronic referitoare la transportul de particule electronopace de-a curmezișul acestor celule subțiri sugerează că acest transport este realizat prin pinocitoză, urmată de o migrare veziculară și apoi de descărcarea conținutului veziculelor prin fuzionarea acestora cu membrana citoplasmatică externă. Toate aceste mecanisme presupun că membranele veziculare și cele externe au o structură moleculară suficient de asemănătoare pentru a permite ca între ele să se poată stabili continuități.

Scanned with OKEN Scanner

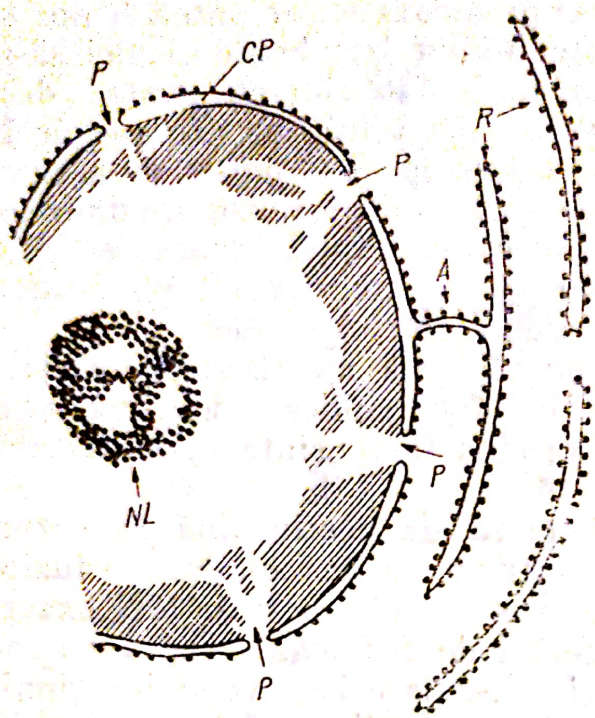


Fig. 5.16. Reprezentare schematică a structurii fine a nucleului.

Imaginea este ocupată aproape în întregime de nucleu, ovalar pe secțiune, și include de asemenea, în partea dreaptă, o porțiune restrînsă de citoplasmă. Învelișul nuclear este constituit dintr-un sac turtit aparținînd reticulului endoplasmic: cisterna perinucleară (*CP*). Membrana internă a cisternei este netedă, pe cînd cea externă este încărcată cu ribozomi (*R*). Se poate observa adeseori că între cavitatea cisternei perinucleare și alte cavități ale reticulului endoplasmic (*A*) există o continuitate. Între nucleoplasmă și citoplasmă există pori circulari (*P*) formați prin fuzionarea membranelor internă și externă ale cisternei perinucleare. Spre partea nucleară a membranei interne a cisternei perinucleare se găsește adesea o condensare de substanță osmiofilă care este străbătută de canale ramificate ce pătrund în ea venind dinspre pori. Nucleul (*NL*) apare ca un agregat sferic de mici granule dense.

ÎNVELIȘUL NUCLEAR

Nucleul este compartimentul celular cel mai clar vizibil în celule vii examinate în contrast de fază. La microscopul electronic nucleul apare mărginit de un înveliș care, în interfază, este alcătuit dintr-o pereche de membrane, groase fiecare de 4—6 mμ și despărțite între ele printr-un spațiu transparent, cisterna perinucleară (fig. 5.16). În numeroase puncte membranele internă și externă apar fuzionate, creîndu-se între nucleu și citoplasmă pori circulari cu un diametru de 50 mμ. Tendința de a fuziona a membranelor, semnalată în unul dintre paragrafele anterioare, ridică posibilitatea ca acești pori să fie doar artefacte; acest lucru este însă improbabil, dată fiind mărimea lor uniformă și apariția lor regulată într-o mare varietate de celule. În ovocitele de amfibii, de exemplu, porii sînt atît de numeroși, încît au o dispunere hexagonală și pot fi văzuți în preparate în care învelișul nuclear este pur și simplu întins pe o grilă de microscop electronic. În celulele aflate în creștere activă sau în celule proteino-secretoare, materialul nuclear este condensat pe fața nucleară a membranei interne și în aceste celule se pot observa canale ramificate ce pleacă de la fiecare por și pătrund adînc în nucleu (fig. 5.16).

Scanned with OKEN Scanner

Dacă acceptăm existența unor pori de asemenea mărime, trebuie admis și faptul că nucleoplasma va avea același conținut în proteine solubile, micromolecule și ioni ca și citoplasma, deoarece un por cu un diametru de 50 mμ ar permite difuziunea liberă chiar și a unor molecule proteice mari. Este posibil totuși ca în pori să existe anumite structuri care nu sînt puse în evidență prin examinarea la microscopul electronic. Rezistența electrică relativ ridicată a membranei nucleare, constatată în unele celule prin măsurători efectuate cu microelectrozi, sugerează faptul că acești pori ar putea să fie parțial blocați cu un material necolorabil. Cu toate acestea, nucleoproteinele cromozomilor n-ar putea trece nici chiar prin pori cu un diametru de 50 mμ, sechestrarea materialului cromozomial în interiorul nucleului rămînînd funcția cea mai evidentă a învelișului nuclear.

Membrana externă a învelișului nuclear este prevăzută cu ribozomi ce aderă de suprafața ei citoplasmatică (fig. 5.16); aceasta sugerează că învelișul nuclear ar trebui privit ca o parte componentă a reticulului endoplasmic. În celulele embrionare sau neoplazice, care se divid rapid, se văd adeseori interconexiuni între reticulul endoplasmic și învelișul nuclear. Astfel de interconexiuni se întîlnesc numai foarte rar în țesuturi diferențiate, deși dacă în fiecare celulă ar exista chiar numai o singură conexiune, aceasta ar fi obligatoriu pusă în evidență prin secționarea la întîmplare a o sută de nuclee. De aceea pare mai probabil că aceste interconexiuni sînt tranzitorii și că ele persistă doar pentru o scurtă perioadă de timp după diviziunea celulară.

Soarta învelișului nuclear în cursul diviziunii celulare a fost cercetată pe celule sarcomatoase și la nivelul vîrfului în curs de creștere al unor rădăcini de plante. În cursul profazei, microelectronografiile nu evidențiază nici o modificare, dar în cursul metafazei se observă cum cisterna perinucleară se fărîmițează, iar fragmentele formate se rotunjesc spre a forma vezicule care ulterior pot fi găsite în citoplasmă, explicînd astfel dispariția membranei nucleare în acest stadiu la celule vii examinate în contrast de fază. Succesiunea fenomenelor, sugerată de cercetări de microscopie electronică, ar fi următoarea: cînd cromozomii se separă în cursul anafazei, aceste vezicule trec în celulelefiice; apoi ele se agregă în jurul masei cromozomiale, se turtesc și înconjură nucleul telofazic spre a forma un nou înveliș nuclear.

Scanned with OKEN Scanner

În celulele vegetale, în cursul anafazei, veziculele membranoase invadează substanța propriu-zisă a fusului; migrînd din regiunile situate în jurul fiecărui centriol, ele urmează linia fibrelor fusului, ajungînd la cromozomii în curs de separare. Unele dintre vezicule îmbracă apoi cromozomii și formează un înveliș nou, în timp ce altele trec mai departe spre linia de separație dintre cele două celule-fiice. Întregul proces de diviziune se desfășoară într-un mod foarte asemănător în celulele animale, ca și în cele vegetale.

Microelectronografiile pun în evidență puține detalii în interiorul cromozomilor (cap. 9), dar în cursul stadiilor tardive ale mitozei se pot vedea fibre tubulare ce țin de fus, cu un diametru de 20—25 mμ, care pleacă de la cromozomi spre regiunile centriolilor.

RETICULUL ENDOPLASMIC ÎN CELULELE MUSCULARE STRIATE

O celulă musculară striată complet diferențiată nu mai crește și nu se divide, ea fiind angajată exclusiv în contracție. În interiorul ei se găsesc puțini ribozomi, răspîndiți liber în citoplasmă, observație care concordă cu ipoteza că rolul reticulului endoplasmic cu suprafața rugoasă este legat de exportul de proteină iar cel al ribozomilor liberi de anabolismul intern. Necesitățile energetice mari ale mușchiului explică abundența mitocondriilor găsite în citoplasmă, printre miofibrile. Prezența unei rețele complexe de tubi constituiți din membrane interne netede este însă o observație surprinzătoare care a fost cercetată în mod amănunțit.

Miofibrilele, orientate în sensul axului longitudinal al celulei și care o străbat pe întreaga ei lungime, sînt împărțite în sarcomere, cu o lungime de 2—3 μ fiecare. Sarcomerele tuturor miofibrilelor individuale se află aliniate la același nivel unele față de celelalte, mobilînd astfel întreaga celulă cu o unitate care se tot repetă și care determină striațiile transversale vizibile la

Fig. 5.17. Reprezentare schematică a reticulului endoplasmic din mușchiul scheletic, bazată pe microelectronografii ale bășicii înotătoare de *Opsanus tau* (pește oceanic din fam. *Batrachoidea*) și ale mușchilor cricotiroidieni ai liliacului, de tipul celei reproduse în fig. 5.18 (după Revel, 1962).

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

microscopul optic (fig. 4.17). Reticulul endoplasmic (denumit adeseori, în aceste celule, reticul sarcoplasmic) este situat, împreună cu mitocondriile, în citoplasmă, în jurul miofibrilelor sau printre ele. Reticulul nu este totuşi dispus la întîmplare, distribuţia sa fiind într-o relaţie bine definită în raport cu sarcomerele miofibrilelor. Această relaţie a fost stabilită încă la începutul secolului la microscopul optic prin cercetarea unor secţiuni de ţesut muscular impregnate cu aur şi argint. Încă de atunci-s-a arătat clar că reticulul este orientat predominant de-a curmei zişul miofibrilelor şi că la diversele vertebrate elementele transversale sînt dispuse în dreptul unor porţiuni diferite ale sarcomerelor. Astfel stînd lucrurile, la descrierea aspectului electronoptic al reticulului trebuie să se atragă atenţia asupra tipului de vertebrat la care se referă cercetările.

În muşchiul scheletic al mamiferelor (fig. 5.17 şi 5.18), benzile *A* ale miofibrilelor sînt înconjurate de nişte tubuşoare longitudinale care se termină în apropierea joncţiunii *A—I* în două canale transversale. Aceste canale sînt în continuitate de-a curmezişul întregii grosimi a celulei musculare şi împreună cu tubuşoarele longitudinale formează un reticul continuu. În jurul benzilor *I* ale unor sarcomere învecinate şi acoperind banda *Z* există o reţea separată cu dispoziţie neregulată care se termină, de asemenea, prin canale transversale. Aceste două sisteme tubulare legate de benzile *A* şi *I* nu sînt conectate între ele, dar elementele lor canaliculare transversale merg paralel unele cu altele la nivelul porţiunii *A—I*. În locul unde aceste canale se învecinează, acestea prind între ele o serie de vezicule subţiri ce au forma unor cîrnăciori. Într-o secţiune longitudinală a unei miofibrile, la nivelul joncţiunii *A—I*, se observă astfel o „triadă" formată din elementele transversale ale sistemelor reticulare *A* şi *I*, între care se află dispuse veziculele în formă de cîrnăciori (fig. 5.17 şi 5.18).

Aşa cum era de prevăzut pe baza cercetărilor efectuate la microscopul optic, în muşchiul scheletic al amfibiilor relaţia dintre reticulul sarcoplasmic şi miofibrile este diferită. Aici sistemul tubular, care în acest caz însoţeşte fiecare sarcomer, se termină de regulă la nivelul benzilor *Z*. Între două sisteme învecinate sînt prinse şi aici mici vezicule, dar în aceşti muşchi veziculele sînt sferice iar canalele transversale prezintă discontinuităţi la nivelul limitelor de separare dintre miofibrile.

Scanned with OKEN Scanner

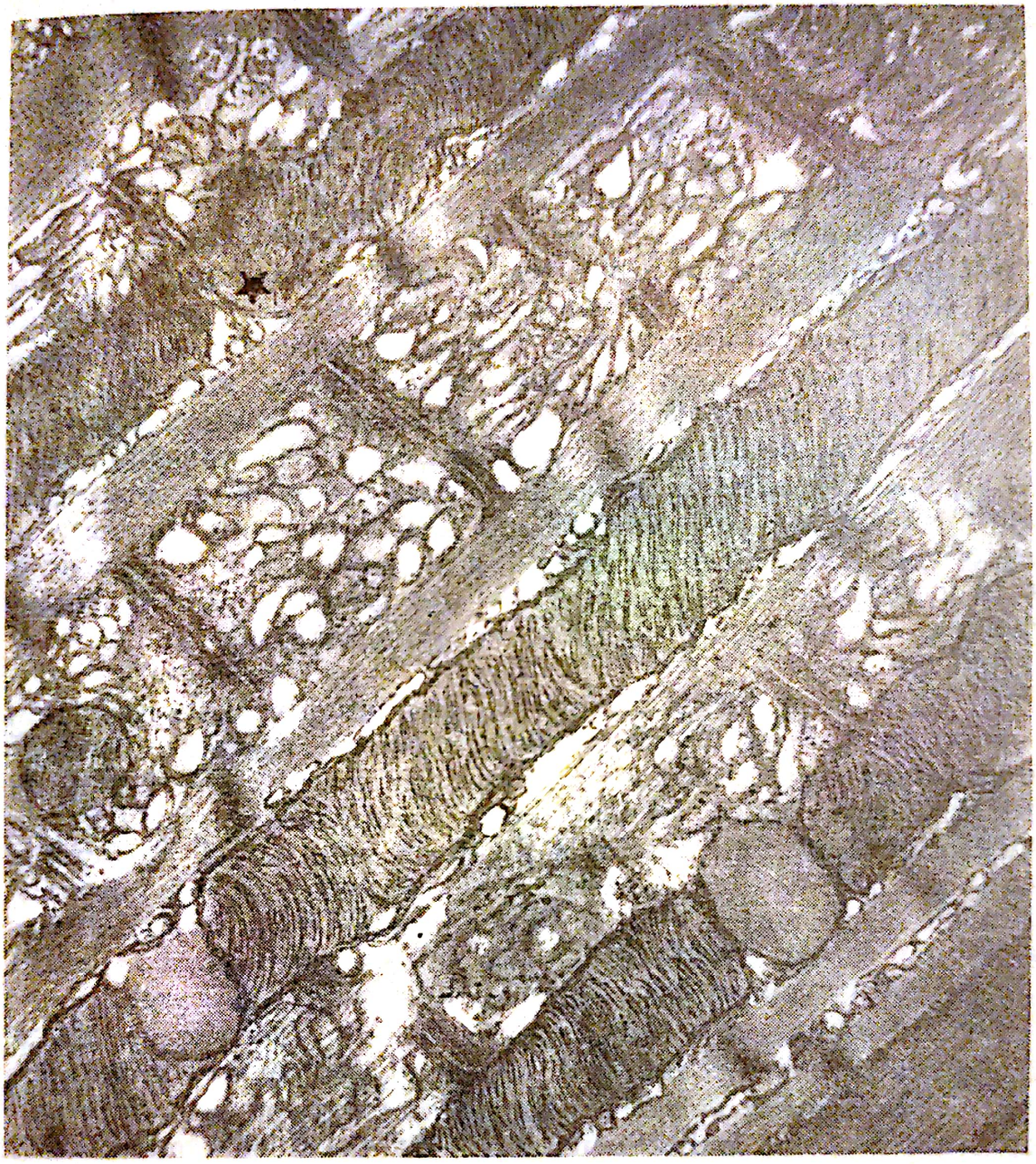


Fig. 5.18. Microelectronografie reprezentînd reticulul sarcoplasmic în mușchiul cricotiroidian al liliacului (mărire 23 000 x).

Secțiunea trece de-a lungul suprafeței miofibrilelor care străbat imaginea în sens diagonal. La nivelul joncțiunilor dintre benzile *A* și *I* se pot vedea triadele. Triadele situate la capetele opuse ale unei benzi *A* sînt legate între ele prin tubușoare longitudinale. În locul marcat cu un asterisc, un asemenea tubușor intermediar părăsește triada, trece printre două mitocondrii și stabilește continuitatea cu o altă triadă din miofibrila vecină (element figurat și în schema reprodusă în fig. 5.17). A se nota marea desime a crestelor din mitocondrii (după Revel, 1962).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru înţelegerea rolului reticulului sarcoplasmic prezintă interes stabilirea relaţiilor dintre reticul şi membrana citoplasmatică. În preparatele fixate cu osmiu, şirurile de vezicule ce formează elementele centrale ale triadelor se extind în afară, dincolo de miofibrile, spre a ajunge să se învecineze cu suprafaţa internă a membranei citoplasmatice, fără a se constata vreo continuitate directă cu această membrană. Totuşi, cercetări recente au arătat că la muşchiul scheletic al peştilor fixarea cu osmiu evidenţiază şirul tipic de vezicule separate între ele, în timp ce după fixarea cu glutaraldehidă elementul central al triadei apare ca o invaginare tubulară a membranei citoplasmatice. De asemenea, în muşchiul croitor al broaştei, deşi după nici una dintre modalităţile de fixare nu se constată vreo interconexiune cu membrana citoplasmatică, dacă muşchiul este introdus pentru o scurtă perioadă de timp înainte de fixare într-o soluţie de feritină, aceasta este regăsită în lumenul elementelor centrale ale triadei şi nu în alte părţi ale celulei. Pare deci posibil ca în general elementele centrale ale triadelor din muşchiul scheletic să reprezinte într-adevăr invaginări ale membranei citoplasmatice.

În afară de variaţiile de organizare a reticulului sarcoplasmic la diferitele grupuri de vertebrate, există de asemenea variaţii ale gradului de dezvoltare a sistemului în diferitele tipuri de muşchi. În muşchiul cardiac, care se contractă relativ încet, reticulul sarcoplasmic este mai puţin dezvoltat decît în musculatura de tip fibrilar descrisă mai sus. Dimpotrivă, muşchii laringieni ai liliacului, care produc un sunet cu frecvenţă ultrasonică, cu rol în orientarea animalului în întuneric, conţin cel mai dezvoltat reticul sarcoplasmic descoperit pînă acum.

Se presupune că reticulul sarcoplasmic îndeplineşte două funcţii: el ar putea fi implicat în transportul de substanţe spre şi de la miofibrilele active sau ar putea participa la conducerea impulsului ce determină contracţia, de la nivelul membranei citoplasmatice spre centrul celulei, al cărei diametru poate atinge 100 μ. Datele fiziologice care vin în sprijinul acestei din urmă supoziţii vor fi discutate în capitolul următor. Morfologic, gradul de diferenţiere este proporţional cu viteza de contracţie şi nu este în legătură cu cheltuiala de energie; muşchiul cardiac este caracterizat prin cel mai ridicat ritm de metabolizare şi totodată printr-un sistem reticular sarcoplasmic dintre cele mai puţin dezvoltate.

Scanned with OKEN Scanner

Rezumînd cele discutate în acest capitol, putem spune că succesul deosebit al metodelor actuale de colorare pentru microscopia electronică constă în faptul că, pe lîngă evidenţierea unor proteine orientate, cum sînt miofibrilele şi colagenul, precum şi a unor nucleoproteine, cum sînt ribozomii, ele au pus în evidenţă diversitatea şi nebănuita bogăţie a membranelor interne. Membranele intracitoplasmatice au o afinitate particulară pentru osmiu şi permanganat şi sînt evidenţiate poate exagerat de clar; concepţiile actuale despre ultrastuctura celulei se bazează, în special pe organizarea membranelor din celulă. Aspectul electronoptic al altor structuri osmiofile, cum sînt miofibrilele, este discutat în alte capitole, dar ar trebui reamintit că componentele care sînt mai puţin uşor colorabile s-au bucurat pînă acum de mai puţină atenţie şi este posibil ca unele să fi scăpat nedecelate pe microelectronografii.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 6

STRUCTURA ŞI FUNCŢIA MEMBRANELOR

PROPRIETĂŢILE DE PERMEABILITATE ALE MEMBRANELOR CELULARE

Microscopul optic nu permite recunoaşterea unei structuri definite la suprafaţa celulelor animale (cap. 1) sau la periferia citoplasmei celulelor bacteriene şi vegetale separate de pereţii lor. Prezenţa unei membrane la nivelul acestor suprafeţe trebuie dedusă indirect sau după microelectronografii. De altfel, anumite fenomene care la prima vedere par să sugereze prezenţa unei membrane limitante — cum ar fi ratatinarea celulelor în soluţii hipertonice, diferenţele de concentraţie ionică găsite între interiorul şi exteriorul celulelor sau potenţialul electric care se poate evidenţia între citoplasmă şi lichidul extracelular în celulele musculare şi nervoase — nu reprezintă în realitate probe concludente ale existenţei unei structuri membranoase definite la nivelul periferiei celulare. Efecte similare pot fi produse de picături de gel proteic lipsite de o structură limitantă.

Lăsînd la o parte cercetările de microscopie electronică, cea mai concludentă dovadă că la nivelul periferiei celulelor există o membrană definită, chiar acolo unde microscopul optic nu evidenţiază vreo membrană, o constituie faptul că ionii şi moleculele nu se deplasează liber către exteriorul şi interiorul celulei. Cercetarea acestei deplasări stă la baza definiţiei operaţionale a „membranei citoplasmatice" dată în cap. 1: ea este acea componentă a ansamblului de structuri ale celulelor ce se află la periferia acestora şi a cărei principală funcţie constă în limitarea sau controlul difuziunii libere a ionilor sau moleculelor din mediul extern spre interiorul citoplasmei. În primele paragrafe ale acestui capitol vom căuta să examinăm care sînt proprietă-

Scanned with OKEN Scanner

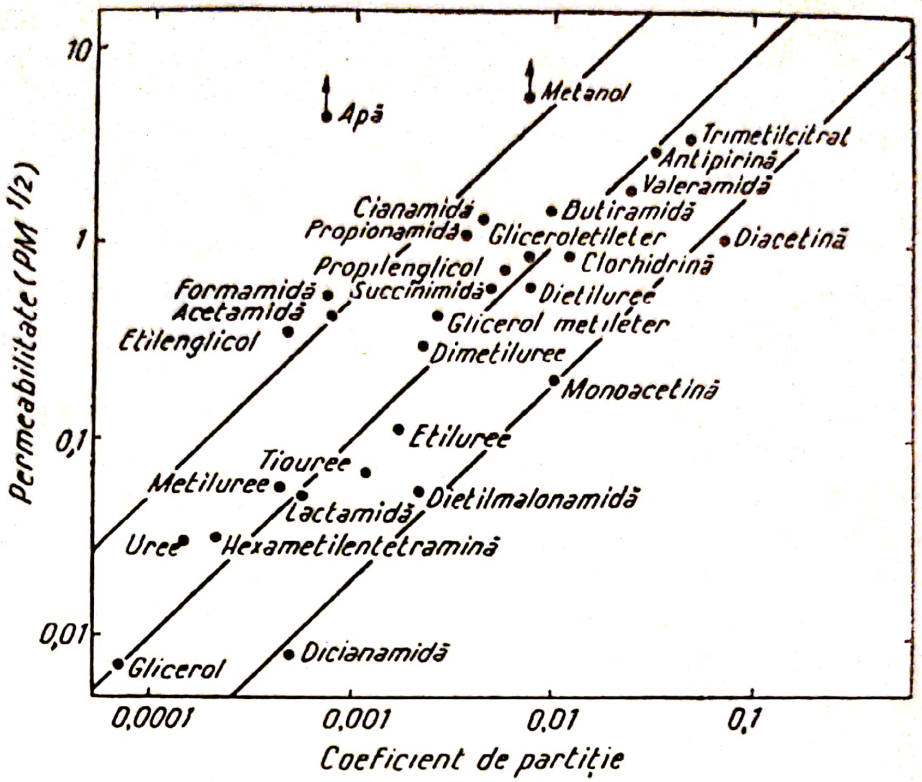


Fig. 6.1. Permeabilitatea celulelor algei *Chara* pentru substanţe organice neelectrolitice cu liposolubilitate şi mărime moleculară diferite.

Produsul dintre coeficientul de permeabilitate (P om/oră) şi rădăcina pătrată a greutăţii moleculare ($M^{1/2}$) este reprezentat grafic în funcţie de coeficientul de partiţie al sistemului ulei de măsline/apă. Între două molecule cu acelaşi coeficient de partiţie, dar cu greutăţi moleculare diferite, molecula mai mică va avea o viteză de difuziune mai mare; este deci de aşteptat ca ea să prezinte un coeficient de difuziune mai ridicat. Dacă moleculele ar traversa membrana prin difuziune simplă nestînjenită, produsul $PM^{1/2}$ ar trebui să fie constant pentru molecule de mărimi diferite (după Collander, 1949).

ţile membranei citoplasmatice ce pot fi deduse pe baza însuşirilor ei de permeabilitate. Vom vedea că permeabilitatea ei scăzută pentru ioni şi ridicată pentru substanţele liposolubile sugerează că ea ar putea fi reprezentată de un strat de lipide sau lipoproteine. (Lipidele alcătuiesc clasa de compuşi chimici din care fac parte toate grăsimile şi uleiurile. Se numesc liposolubile substanţele cu o solubilitate relativ mare în grăsimi. Lipoproteinele sînt agregate moleculare care conţin atît lipide, cît şi proteine.)

Relaţia dintre permeabilitate şi liposolubilitate este ilustrată de rezultatele unor serii de experienţe efectuate pe o algă unicelulară mare, *Chara ceratophylla*, rezultate redate în fig. 6.1.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a discuta aceste rezultate, trebuie mai întîi să definim doi termeni: coeficientul de partiţie şi coeficientul de permeabilitate.

Coeficientul de partiţie ulei/apă este o măsură a solubilităţii relative a unei substanţe în ulei şi în apă. El este definit ca raportul $\frac{\text{concentraţia în ulei}}{\text{concentraţia în faza apoasă}}$ pentru o substanţă dizolvată în condiţii de stabilire a unui echilibru de o parte şi de cealaltă a unei interfeţe ulei-apă. Coeficientul de partiţie al unei substanţe depinde de capacitatea moleculelor sale de a forma legături de hidrogen (anexa 2).

Coeficientul de permeabilitate este o măsură a vitezei cu care moleculele pot traversa o membrană. Să considerăm două soluţii ale aceleiaşi substanţe, avînd concentraţii diferite şi care sînt separate printr-o membrană. Moleculele substanţei dizolvate din cele două soluţii se află într-o mişcare termică continuă şi haotică. Orice moleculă a substanţei dizolvate se mişcă permanent în lungul şi în latul recipientului, de partea membranei unde se găseşte, urmînd o cale neregulată şi ciocnindu-se mereu cu moleculele de apă şi cu alte molecule de aceeaşi natură cu ea însăşi. Dacă, în aceste condiţii, afirmăm că o membrană „este permeabilă pentru substanţa dizolvată", aceasta înseamnă că în cazul în care o moleculă a substanţei dizolvate ajunge, în cursul călătoriei ei, să atingă membrana, ea are o anumită şansă să treacă de partea cealaltă ca rezultat al mişcării termice haotice (adică al mişcării întîmplătoare a moleculelor substanţei dizolvate, a moleculelor de apă şi a moleculelor membranei).

Dacă spunem că membrana „limitează difuziunea liberă a substanţei dizolvate", aceasta înseamnă că, deşi există o şansă ca molecula substanţei dizolvate să traverseze membrana, este mai probabil că ea va fi întoarsă înapoi şi îşi va continua călătoria de aceeaşi parte ca mai înainte. Dacă membrana nu impune vreo restricţie difuziunii libere, atunci molecula substanţei dizolvate va avea şanse egale de a traversa membrana sau de a fi întoarsă înapoi.

Se poate recurge la diferite modele pentru a ilustra o membrană permeabilă ce limitează difuziunea liberă. De exemplu, o foiţă dintr-un material solid prevăzută cu găuri suficient de mari pentru ca moleculele substanţei solvite să treacă prin ele, va acţiona ca o membrană de acest tip. La fel va acţiona un strat

Scanned with OKEN Scanner

fluid continuu de ulei, cu condiţia ca substanţa dizolvată aleasă să aibă un coeficient de partiţie ulei/apă de ordin intermediar. Pentru o substanţă cu un coeficient de partiţie foarte scăzut, stratul de ulei va fi practic impermeabil. O substanţă cu un coeficient de partiţie ridicat va ajunge să fie selectiv concentrată în stratul de ulei. O dată saturat, stratul nu va mai reprezenta o barieră în calea difuziunii libere a substanţei dizolvate între cele două faze apoase.

Putem să ne întoarcem acum la rezultatele redate în fig. 6.1. Coeficientul de permeabilitate al unei membrane, pentru o anumită substanţă solvită, este definit prin numărul net de moli din substanţa dizolvată respectivă ce traversează fiecare centimetru pătrat al membranei în unitatea de timp, atunci cînd diferenţa de concentraţie de o parte şi de cealaltă a membranei este de un mol/cm^3. În experienţele de felul celor la care ne referim, coeficienţii de permeabilitate sînt determinaţi introducîndu-se substanţa aleasă pentru un anumit timp în mediul de suspendare a celulelor, după care, celulele sînt spălate iar apoi se cercetează concentraţia intracelulară a substanţei dizolvate. Permeabilitatea membranei celulare a algei *Chara* pentru substanţe cu liposolubilitate ridicată, cum sînt esterii şi cetonele, este atît de mare, încît coeficienţii nu pot fi măsuraţi în mod convenabil şi ca atare ele nu sînt incluse în fig. 6.1. Coeficienţii de permeabilitate pentru uree şi glicerol sînt scăzuţi. Pentru substanţe cu coeficienţi de partiţie intermediari (de exemplu, alcooli), permeabilitatea este de asemenea de ordin intermediar. Se poate calcula că valorile coeficienţilor de permeabilitate, pentru substanţele dizolvate incluse în fig. 6.1, sînt cu foarte mult inferioare celor care ar fi fost de aşteptat dacă ar exista difuziune liberă spre interiorul şi exteriorul celulei. Membrana celulară a algei *Chara* constituie deci o barieră în calea difuziunii libere pentru toate substanţele dizolvate, exceptînd poate pe cele cu liposolubilitate foarte ridicată.

Coeficienţii de permeabilitate redaţi în fig. 6.1 sînt o măsură a deplasării globale a unor substanţe dizolvate din lichidul extracelular spre interiorul celulei. Ei se referă la mişcarea substanţei prin totalitatea structurii dispuse la periferia celulei. După cum s-a menţionat în cap. 5, microelectronografiile arată existenţa, la periferia citoplasmei tuturor celulelor, a unei structuri osmiofile groase de 5,8 mμ. Într-unul dintre paragrafele urmă-

Scanned with OKEN Scanner

toare a alecestui capitol vom discuta datele care arată că această structură este un strat de lipoproteină. Pentru unele celule, acest strat reprezintă aparent unica barieră în calea difuziunii la nivelul periferiei celulare, iar pentru alte celule ea constituie probabil principala barieră de difuziune, aşa încît termenul de „membrană citoplasmatică" nu mai are doar un sens descriptiv, ci a dobîndit acum o semnificaţie mai precisă. Este de menţionat totuşi că bariera de difuziune înspre interiorul şi exteriorul celulei este adesea mai complexă, incluzînd pereţi, capsule sau membrane bazale şi, poate, şi o zonă corticală geliformă din citoplasmă. În cazul celulelor vegetale, tonoplastul reprezintă o barieră suplimentară în calea difuziunii spre interiorul vacuolei care ocupă partea cea mai mare a volumului celular.

În diverse tipuri de celule, valorile coeficientului global de permeabilitate (adică coeficientul de permeabilitate pentru mişcarea din lichidul extracelular spre interiorul celulei) pentru orice substanţă dizolvată dată variază în limite largi. Nu se poate preciza deocamdată în ce măsură acest lucru se datorează unor variaţii ale proprietăţilor stratului lipoproteic de la periferia citoplasmei diferitelor tipuri de celule sau prezenţei în unele celule a unor bariere suplimentare de difuziune. O altă dificultate, aceea de a şti dacă o substanţă solidă a pătruns în celulă prin traversarea membranei citoplasmatice sau prin pinocitoză, a fost discutată în cap. 5.

Cercetările cantitative întreprinse asupra difuziunii unei mari diversităţi de substanţe dizolvate în celule dintre cele mai variate ne permit să generalizăm concluziile bazate pe studiul celulelor algei *Chara* şi să conchidem că mişcarea substanţelor dizolvate prin membranele celulare scoate în evidenţă existenţa unei corelaţii generale între permeabilitate şi coeficientul de partiţie ulei/apă. Dar aceste cercetări asupra difuziunii pasive nu ne dau nici o altă informaţie mai detaliată. Pentru a putea discuta ce alte proprietăţi ale membranelor celulare mai pot fi deduse pe baza unor cercetări de permeabilitate, va trebui să descriem în paragraful următor anumite tipuri de fenomene de permeabilitate, diferite nu numai cantitativ, dar şi calitativ de difuziunea pasivă examinată pînă aici: este vorba despre fenomenele de „transport activ" şi de „difuziune favorizată". În paragraful ulterior vom continua să discutăm mişcarea ionilor prin membrane.

Scanned with OKEN Scanner

TRANSPORTUL ACTIV, DEPLASAREA APEI ŞI DIFUZIUNEA FAVORIZATĂ

Atunci cînd de o parte şi de cealaltă a unei membrane permeabile există o diferenţă de concentraţie a unei substanţe dizolvate, difuziunea moleculară (adică mişcarea termică întîmplătoare) creează un flux net de molecule ale substanţei solvite ce traversează membrana dinspre partea cu concentraţie mare spre cea cu concentraţie mică. În cercetările asupra proprietăţilor de permeabilitate ale membranelor celulare se întîlneşte şi efectul invers — o deplasare a substanţei dizolvate prin membrană într-un sens opus gradientului de concentraţie. O deplasare împotriva gradientului de concentraţie sau, în termeni mai generali, o deplasare a moleculei sau ionului transportat spre o stare de energie potenţială termodinamică mai ridicată este denumită *transport activ*.

Transportul activ reclamă întotdeauna un aport de energie, rezultat din activitatea metabolică a celulei. Există dovezi, pe care le vom discuta în paragraful următor, în sprijinul existenţei unui transport activ de ioni, precum şi date care arată că energia necesară acestui proces derivă din omniprezentul ATP. Alte exemple de transport activ sînt reprezentate de introducerea în celulă a aminoacizilor şi zaharurilor. Termenul de „transport activ" este totuşi, într-un anumit sens, o denumire greşită, deoarece orice proces de transport este constituit, de fapt, dintr-o serie de trepte ce se desfăşoară pasiv şi care, fiecare în parte, ca şi întreg sistemul, incluzînd componentele membranei, ATP şi substanţa dizolvată sau ionii transportaţi, trec într-o stare de energie potenţială termodinamică mai scăzută. În cazul transportului activ se realizează un cîştig de energie potenţială termodinamică a substanţei dizolvate sau a ionului transportat, cu preţul unei pierderi de energie într-o altă parte a sistemului privit în ansamblu.

Din datele reproduse în fig. 6.1 se poate constata că coeficientul de permeabilitate pentru deplasarea apei spre interiorul celulelor algei *Chara* (ca şi, de altfel, într-o diversitate de celule) este anormal de mare în raport cu coeficientul de partiţie $\left(\text{coeficientul de partiţie pentru apă} = \frac{\%\ \text{concentraţie în ulei}}{100}\right)$. Mişcarea apei constituie un exemplu al unei categorii de feno-

mene de permeabilitate ce pot fi deosebite de tipul simplu de difuziune, examinat în primul paragraf, nu numai prin aceea că coeficienţii de permeabilitate sînt mari în raport cu coeficienţii de partiţie, dar şi printr-o serie de diferenţe calitative ale fenomenului. Alte exemple de difuziune anormală, reunite sub denumirea de difuziune favorizată, sînt reprezentate de mişcarea glucozei şi glicerolului înspre interiorul globulelor roşii umane, care va fi discutată mai tîrziu. Este vorba aici de situaţii în care deplasarea substanţei dizolvate are loc în josul gradientului de concentraţie şi care sînt deci diferite de fenomenele de transport activ.

Caracteristica prin care deplasarea apei diferă calitativ de simpla difuziune este următoarea: atunci cînd există un flux net ce traversează o membrană (la o mare diversitate de celule animale şi vegetale), coeficientul de permeabilitate este mai mare decît în condiţii de echilibru (cînd fluxul de apă ce trece într-un sens este egal cu cel ce trece în sens contrar). Permeabilitatea pentru un flux net (coeficientul de permeabilitate osmotică) poate fi dedusă în cazul globulelor roşii, de exemplu, din duratele hemolizei în soluţii hipotonice. Difuziunea în condiţii de echilibru poate fi studiată cu ajutorul izotopilor, iar coeficientul de permeabilitate pentru apă în aceste condiţii (coeficientul de permeabilitate prin difuziune) poate fi determinat prin viteza de pătrundere în celulă a apei grele. În cazul globulelor roşii, se constată că coeficientul de permeabilitate osmotică este de 2—3 ori mai mare decît coeficientul de difuziune. Deplasarea apei dintr-o parte în cealaltă a unor membrane este deci un fenomen co-operativ. O moleculă de apă trece mai uşor printr-o membrană dacă alte molecule de apă circulă concomitent în aceeaşi direcţie. Vom vedea că există dovezi care atestă existenţa unor efecte similare în cazul anumitor tipuri de deplasări ionice.

TRECEREA IONILOR PRIN MEMBRANE

Pentru discutarea modului în care ionii traversează membranele va trebui mai întîi să examinăm relaţia dintre diferenţele de concentraţie şi diferenţele de potenţial electric de o parte şi de cealaltă a membranei. Difuziunea unor ioni printr-o membrană

Scanned with OKEN Scanner

va genera în mod normal o diferență de potențial, drept consecință a vitezelor diferite de difuziune ale ionilor pozitivi și negativi. Această diferență de potențial interferează cu difuziunea simplă determinată de diferențele de concentrație. Întrucît ionii tind să se deplaseze în josul gradientului de concentrație, dar și în josul gradientului de potențial, poate să apară o situație de echilibru în care să existe o diferență stabilă de concentrație de o parte și de alta a membranei, perfect contrabalansată de o diferență de potențial. Pe baza unor argumente termodinamice (anexa 5), se poate demonstra că în asemenea condiții de echilibru diferența de potențial (E, măsurată în milivolți) și diferența de concentrație pentru orice tip de ioni (de exemplu, K^+), față de care membrana este cît de cît permeabilă, sînt legate prin următoarele ecuații:

$$E = 58 \log_{10} \left(\frac{\text{concentrația în exterior}}{\text{concentrația în interior}} \right)$$ pentru ionii pozitivi monovalenți la 20 °C

și

$$E = 58 \log_{10} \left(\frac{\text{concentrația în interior}}{\text{concentrația în exterior}} \right)$$ pentru ionii negativi monovalenți la 20 °C.

O serie de celule dintre cele mai diferite, cum ar fi celulele musculare, axonii giganți ai sepiei și anumite celule vegetale, sînt suficient de mari spre a permite implantarea unor electrozi pentru măsurarea potențialului de o parte și de alta a întregii structuri aflate la nivelul periferiei celulare. Dacă există posibilitatea de a se măsura potențialul ce se stabilește de-a curmezișul membranei și dacă se pot, de asemenea, determina concentrațiile existente de cele două părți ale ei, atunci există și posibilitatea ca potențialul de echilibru calculat pentru orice tip de ion dat să fie comparat cu potențialul măsurat. Rezultatele unor astfel de măsurători efectuate pe axonul gigant de sepie sînt redate în tabelul 6.1.

Dacă pentru un tip dat de ion ar exista o concordanță între potențialul calculat și cel măsurat, aceasta ar arăta că ionii de acest tip sînt în echilibru de o parte și de cealaltă a membranei și că o traversează numai în virtutea unor procese de difuziune simplă sau favorizată. Această condiție nu este însă satisfăcută în cazul ionilor de Na^+, K^+ sau Cl^- aflați de o parte și de alta a membranei axonului de sepie. În cazul ionilor de K^+ și Cl^- se constată o ușoară abatere de la echilibru, iar diferențele de

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 6.1

Potențiale de membrană și concentrații saline la axonii giganți de sepie

Ion	Concentrația internă c_i (milimoli/litru)	Concentrația externă c_e (milimoli/litru)	Potențial de echilibru calculat (milivolți) ($E = \pm 58 \log \frac{c_i}{c_e}$)	Potențial de membrană măsurat (milivolți)
K^+	400	20	−75	
Cl^-	110	560	−41	−63 la −72
Na^+	50	440	+55	

Date după Hodgkin, A. L., *Proc. Roy. Soc.*, *148 B*,1, 1958 și Keynes, R. D., „J. Physiol.", *163*, 19P, 1962.

concentrație a ionilor Na^+ se abat foarte mult de la condițiile de echilibru.

Există motive să presupunem că concentrațiile globale ale ionilor de Na^+, K^+ și Cl^- găsite în citoplasma axonului de sepie nu sînt mult diferite de concentrațiile libere ale acestor ioni. Viteza de difuziune a ionilor de K^+ în masa citoplasmei, de exemplu, nu este cu mult diferită de viteza lor de difuziune în soluție liberă. Se pare, într-adevăr, că ionii monovalenți nu sînt legați de celulă într-o măsură prea importantă și că o diferență mare între potențialul măsurat și potențialul de echilibru — pentru un tip dat de ion monovalent — trebuie să arate că există un transport activ al acestui ion prin membrana respectivă.

La toate celulele, cu excepția globulelor roșii ale unor mamifere, raportul dintre Na^+ intern și cel extern este mult mai scăzut decît valoarea de echilibru. De aceea, în membrana majorității celulelor înseamnă că trebuie să existe o „pompă de ioni" care transportă activ ionii de Na^+ prin membrană în afara celulei; se pare că această pompă este adesea o pompă cu dublu sens, introducînd în celulă un ion de K^+ pentru fiecare ion de Na^+ transportat în afară (sau poate înlocuind ioni de K^+ și Na^+ și în alte raporturi decît 1 : 1). În cazul axonilor de sepie și al globulelor roșii s-a arătat că energia pentru acest transport activ provine din scindarea ATP și că pompa este inactivată de anumiți inhibitori ai unor enzime. Mecanismele moleculare care intervin în acest proces vor fi discutate în paragrafele ulte-

Scanned with OKEN Scanner

rioare. Se crede că în membranele citoplasmatice ale axonului de sepie şi în membranele tonoplastului celulelor vegetale există şi pompe de Cl^-.

Oricărei pompări active i se supraadaugă o anumită difuziune de ioni de K^+, Na^+ şi Cl^- prin membrană, care continuă şi atunci cînd pompele sînt inactivate. În cazul axonului de sepie aflat în stare de repaus, coeficienţii de permeabilitate pasivă pentru ionii de K^+ şi Cl^- sînt de aproximativ 100 de ori mai mari decît coeficientul de permeabilitate pasivă pentru ionii de Na^+. Deşi activitatea pompei schimbătoare de ioni interesează atît ionii de Na^+, cît şi pe cei de K^+, permeabilitatea relativ redusă pentru Na^+ a membranei în repaus este aceea care determină abaterea mai mare de la condiţiile de echilibru constatate în cazul ionilor de Na^+. Coeficienţii scăzuţi de permeabilitate ionică constituie argumente suplimentare în sprijinul supoziţiei că bariera de difuziune este alcătuită din lipide sau lipoproteine. Ionii mici sînt deosebit de insolubili în ulei; pentru a pătrunde într-un mediu uleios, ei trebuie fie să se debaraseze de învelişul lor de molecule de apă de hidratare (menţinut de cîmpul puternic electrostatic în imediata vecinătate a suprafeţei ionilor mici), fie să aducă apă de hidratare în mediul uleios şi să rupă un număr de legături de hidrogen dintre apa de hidratare şi moleculele înconjurătoare ale fazei apoase.

Vom încheia acest paragraf printr-o scurtă discuţie asupra modificărilor permeabilităţii ionice care însoţesc activitatea celulelor nervoase şi musculare. Impulsurile electrice care circulă de-a lungul membranelor celulelor nervoase şi ale celulelor muşchilor scheletici în cursul activităţii acestora sînt denumite *potenţiale de acţiune*. În cursul trecerii unui potenţial de acţiune printr-un anumit punct al membranei, perturbaţia electrică ce se apropie determină mai întîi o reducere uşoară a amplitudinii potenţialului de membrană. Aceasta duce la o creştere trecătoare a permeabilităţii pentru ionii de Na^+ şi la stabilirea unui flux de ioni de Na^+ spre interiorul citoplasmei, ceea ce reduce şi mai mult potenţialul şi accentuează permeabilitatea faţă de ionii de Na^+. Astfel, modificările de potenţial şi de permeabilitate acţionează co-operativ, o perturbare iniţială minoră provocînd o perturbare mare prin care potenţialul transmembranic local este răsturnat şi ajunge să se apropie de potenţialul de echilibru corespunzător diferenţei de concentraţie a ionilor de

Na^+ de o parte şi de cealaltă a membranei (tabelul 6.1). Se pare că o dată cu fluxul ionilor de Na^+ are loc şi un oarecare flux al ionilor de Ca^{++} înspre interiorul citoplasmei. Această fază este urmată, la un răstimp de aproximativ o milisecundă în cazul axonului de sepie, de o revenire la normal a permeabilităţii pentru ionii de Na^+. Dar între timp se produce o creştere a permeabilităţii pentru ionii de K^+; fluxul de ioni de K^+ îndreptat spre exterior readuce membrana la potenţialul de repaus. În cazul axonilor de sepie (la 18°C), potenţialul şi permeabilitatea pentru ionii de K^+ revin la valorile de repaus în decurs de aproximativ 4 milisecunde. Depolarizarea locală trecătoare (sau inversarea polarizării) se extinde, producînd o uşoară depolarizare ce precede potenţialul de acţiune care înaintează. Procesul descris se repetă astfel mai departe pe parcursul membranei, aşa încît de-a lungul ei progresează o undă de depolarizare trecătoare (potenţialul de acţiune).

Aceste modificări ale permeabilităţii ionice legate de potenţialul de acţiune au fost studiate pe axonii de sepie şi pe celule musculare de broască de către Hodgkin, Huxley şi alţii cu ajutorul tehnicii deosebit de elegante a „agrafei de voltaj" a lui Marmont şi Cole. Diferenţa de potenţial transmembranică este redusă şi menţinută la o serie de valori diferite prin curenţi furnizaţi de nişte electrozi fini implantaţi în celulă, iar curentul ce traversează membrana este determinat pe baza curentului înregistrat la nivelul electrodului. Ionii ce transportă curentul sînt identificaţi prin studiul efectelor produse de anumite modificări ale concentraţiilor saline externe şi prin studii cu izotopi radioactivi de Na^+ şi K^+. Aplicarea acestor tehnici la celulele muşchiului cardiac este mai dificilă, dar modificările de permeabilitate legate de potenţialul de acţiune par să fie şi în aceste celule de aceeaşi natură ca în celulele muşchiului scheletic. Există totuşi deosebiri în mărimea şi în relaţiile în timp ale modificărilor de permeabilitate, care fac ca intervalul de timp pînă la revenirea la condiţiile de repaus să fie mai lung (o secundă sau chiar mai mult pentru inima de broască, la 18°C).

Transmiterea unui potenţial de acţiune de-a lungul unei celule dintr-un muşchi scheletic este iniţiată de acţiunea acetilcolinei asupra membranei celulei musculare la nivelul joncţiunilor neuromusculare. Acetilcolina este liberată în „şarje" de la punctele terminale ale axonilor ce inervează muşchiul respectiv

Scanned with OKEN Scanner

(„șarje" care corespund probabil veziculelor vizibile pe microelectronografii, așa cum s-a arătat în cap. 5). În mușchiul de broască, amplu studiat de către Katz, acetilcolina produce o creștere locală a permeabilității membranei celulei musculare atît față de ionii de Na^+, cît și față de cei de K^+. Fluxul de ioni ce rezultă astfel — predominant un flux de Na^+ spre interiorul celulei — reduce potențialul de membrană și inițiază perturbația electrică ce se extinde apoi de-a lungul membranei celulei musculare. Un efect diferit se întîlnește în cazul membranelor celulelor musculare ale cordului de broască din regiunea în care sînt generate impulsurile. Aici, după toate aparențele, acetilcolina produce exclusiv o creștere specifică a permeabilității pentru K^+.

În aceste paragrafe referitoare la proprietățile de permeabilitate ale membranelor am încercat să vedem dacă un mecanism particular dat se întîlnește numai în anumite celule sau și la alte tipuri celulare. În multe cazuri însă nu putem spune cît este de răspîndit un anumit tip de permeabilitate, deoarece dificultăți de ordin experimental împiedică studierea lui în mai mult de unul sau cîteva tipuri celulare. Astfel, celulele epiteliului intestinal încorporează foarte activ zaharurile și constituie un material deosebit de adecvat pentru studiul acestui proces; celulele musculare și nervoase, precum și unele celule vegetale sînt suficient de mari pentru a permite implantarea de electrozi.

Nu știm în ce măsură proprietățile de permeabilitate studiate în unul sau cîteva tipuri de celule sînt legate de caracteristici speciale ale membranelor acestor celule sau de caracteristici generale proprii structurii membranelor existente în toate celulele. Anumite caracteristici par să fie comune membranelor din practic toate celulele: marea permeabilitate pentru substanțe liposolubile, anormala permeabilitate pentru apă și anumite mecanisme pentru transportul activ de ioni de Na^+ și K^+.

COMPOZIȚIA CHIMICĂ A MEMBRANELOR

Ne vom ocupa acum de un mod de abordare complet diferit al studiului proprietăților și structurii membranelor. Pornind de la faptul că studiile de permeabilitate îngăduie să se bănuiască

TABELUL 6.2

Compoziția chimică a membranelor citoplastică și mitocondrială (toate

	Tip de celulă	Fosfolipide				
		Acid fosfatidic	Fosfatidiletanolamină	Fosfatidilcolină	Fosfatidilserină	Alte fosfolipide (sfingomielină etc.)
MEMBRANA CITOPLASMATICA	Globule roșii de bou (1,6)	sub 1%	~2%	~3%	~3%	10 pînă la 15%
	Protoplaști bacterieni (2) (*Staphylococcus aureus*)	lipide totale ~20%				
	Cifre estimative pentru teaca de mielină a nervului (3,4)	—	10%	5 pînă la 10%	5%	—
	Membrane mitocondriale (5)	—	5 pînă la 20%	10 pînă la 25%	sub 5%	—

[1] Pappart, A. K. și Ballentine, R., în *Modern Trends in Biochemistry*, sub red. E.S.G. Barron, Academic Press, New York, 1952.
[2] Mitchell, P., "Biochem. Soc. Symposia", *16*, 73, 1959.
[3] Engstrom, A. și Finean, J. B., *Biological Ultrastructure*, Academic Press, New York, 1958.

Scanned with OKEN Scanner

valorile exprimă % față de greutatea uscată totală)

Cerebrozide (cerasină etc.)	Colesterol	Alte lipide	Proteină	Hidrocarbonate (sau componenta hidrocarbonată a glicoproteinei)
foarte puține	~10%	sub 3%	60 pînă la 70% (incluzînd enzimele de transport activ	substratul caracterelor de grup sanguin, în globulele roșii umane, la nivelul suprafeței externe a membranei
(foarte puțin colesterol)			~40% (incluzînd o mare diversitate de enzime)	pînă la 40%
10 pînă la 15%	15 pînă la 20%	—	20 pînă la 40%	coloraţii histochimice arată prezența de hidrocarbonate
—	1%	—	50—60% (incluzînd enzime ale lanțului de transfer de electroni)	

* Dawson, R. M. C., "Biol. Revs.", *32*, 188, 1957.
* Ball, E. G. și Joel, C. D., "Int. Rev. Cytol.", *13*, 99, 1962.
* Dawson, R. M. C., Hemington, N. și Lindsay, D. B., "Biochem. J.", *77*, 226, 1960.

Scanned with OKEN Scanner

includerea în structura membranelor a unor lipide, să încercăm să extragem lipidele din anumite celule adecvate și să vedem dacă acestea ne dau vreo indicație despre modul în care s-ar putea prezenta structura membranei.

Globulele roșii ne oferă un material deosebit de favorabil pentru acest tip de analiză. Citoplasma unei astfel de celule conține puține componente în afară de hemoglobină, care poate fi îndepărtată prin hemoliză, astfel încît rămîne o „fantomă" celulară. La microscopul cu contrast de fază ea se prezintă ca un înveliș fin avînd aproximativ același diametru cu celula originală. „Fantoma" își păstrează toate lipidele, precum și unele din proprietățile de permeabilitate ale celulei originale: dacă se recurge la tehnica de hemolizare blîndă, prin treceri succesive în soluții de tonicitate descrescîndă, „fantoma" păstrează capacitatea de a concentra K^+ și de a pompa în afară Na^+ în prezență de ATP. Pare justificat să se considere că membrana „fantomei" este în mare măsură similară cu membrana celulei originale, deși este posibil ca structura ei fină să fi fost modificată de trecerea prin ea a moleculelor de hemoglobină cu un diametru de 6 mμ, dat fiind că membrana este în mod normal deosebit de impermeabilă față de ionii de sodiu al căror diametru, în stare hidratată, este de-abia de 0,5 mμ. Faptul că, după o hemoliză blîndă, permeabilitatea față de ionii de Na^+ revine la o valoare relativ scăzută reprezintă o dată experimentală suplimentară referitoare la comportamentul membranei globulelor roșii, care trebuie integrată într-un fel oarecare în imaginea finală pe care ne-o vom face despre structura acestei membrane.

Compoziția chimică a „fantomelor" obținute din globule roșii de bou este redată în tabelul 6.2. Cantitatea de lipide existente în „fantomă" (și în globula roșie de origine) este suficientă pentru a forma un strat gros de 3 mμ în jurul întregii suprafețe celulare. Cantitatea de proteine conținute în „fantoma" celulară este și ea suficientă pentru a forma la suprafață un strat de aceeași grosime. Acestea nu reprezintă decît date estimative asupra cantității de proteine și de lipide existente. Dacă aceste componente sînt structurate sub forma unor straturi uniforme rămîne o chestiune deschisă ce va fi discutată în paragrafele ulterioare.

Mai există alte două surse din care se poate obține materialul

Scanned with OKEN Scanner

constitutiv al membranelor în cantităţi suficient de mari şi într-o formă destul de pură pentru a servi la analizarea chimică: protoplaştii bacterieni şi mielina nervilor. La multe bacterii, pereţii exteriori şi capsulele pot fi îndepărtate prin digestie enzimatică, astfel încît rămîne un protoplast bacterian (celula bacteriană minus peretele extern şi capsula), înconjurat de o membrană care continuă să prezinte principalele proprietăţi de permeabilitate ale bacteriei originale. Materialul ce intră în constituţia membranei protoplaştilor bacterieni poate fi obţinut, ca şi în cazul „fantomelor" de globule roşii, provocîndu-se plesnirea protoplastului în soluţii hipotone, materialul ce alcătuieşte membrana fiind apoi sedimentat prin centrifugare. Compoziţia acestui material este şi ea inclusă în tabelul 6.2. Cantitatea de lipide existente în membranele protoplaştilor de stafilococ auriu este suficientă pentru a forma un strat gros de 1—2 mμ, iar cea de proteine şi de hidrocarbonate —, un strat de 3—4 mμ.

Tecile de mielină ale nervilor se formează, aşa cum s-a arătat în cap. 5, prin proliferarea membranei celulelor Schwann. Ne putem aştepta deci la o oarecare asemănare între compoziţia chimică a materialului ce alcătuieşte teaca de mielină şi cea a materialului existent în membranele „fantomelor" de globule roşii şi de protoplaşti bacterieni. Într-adevăr, în cele trei tipuri de materiale se găsesc aceleaşi componente — fosfolipide, proteine şi hidrocarbonate —, deşi proporţiile lor relative sînt într-o oarecare măsură diferite (tabelul 6.2). Există dovezi că în structura tuturor acestor membrane poate fi încorporată o anumită cantitate de substanţe hidrocarbonate, probabil predominant la suprafaţa externă a membranei.

PROPRIETĂŢILE FOSFOLIPIDELOR ŞI ALE ALTOR LIPIDE POLARE

Structura moleculară a lipidelor cuprinse în tabelul 6.2 este ilustrată în fig. 6.2 şi 6.3, precum şi în tabelele 6.3, 6.4 şi 6.5. Un fosfolipid tipic, fosfatidil-etanolamina, este reprezentat în fig. 6.4. Fosfolipidele naturale conţin de regulă, aşa cum reiese din această figură, două lanţuri hidrocarbonice, unul saturat şi unul nesaturat.

Scanned with OKEN Scanner

Fosfolipidele şi cerebrozidele sînt lipide polare. Moleculele lor conţin lanţuri lungi hidrocarbonice (lipidice), care sînt puternic hidrofobe, precum şi grupări polare, adică grupări capabile să formeze legături de hidrogen (anexa 2) şi care sînt deci hidrofile. În cazul fosfolipidelor, gruparea fosfatică purtătoare de sarcină electrică, precum şi grupările ionice din tabelul 6.3 fac

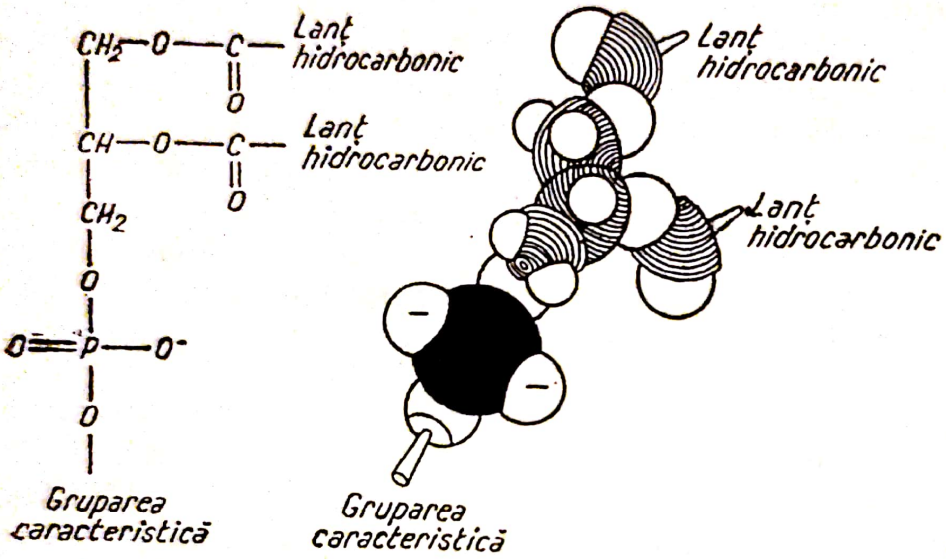


Fig. 6.2. Formula chimică şi desenul unui model molecular al grupării prezente în acidul fosfatidic, precum şi în fosfatidil-etanolamină, fosfatidil-colină şi fosfatidil-serină, care leagă gruparea corespunzătoare din tabelul 6.3 de două lanţuri hidrocarbonice de tipul celor reprezentate în tabelul 6.4.
(În toate aceste modele moleculare, atomii de fosfor sînt redaţi în negru).

ca această parte a moleculei să fie puternic hidrofilă. Colesterolul poate fi clasat de asemenea printre lipidele polare, deşi gruparea sa polară (un singur —OH) nu este decît slab hidrofilă.

Sub formă de molecule izolate, lipidele polare cu grupări puternic hidrofile sînt mai degrabă insolubile atît în apă, cît şi în ulei. Ele ajung, totuşi, într-o situaţie favorabilă din punct de vedere energetic atunci cînd se află la nivelul unei interfeţe ulei-apă, precum şi atunci cînd se adună laolaltă în faza apoasă sau uleioasă spre a forma *micelii* (fig. 6.5). Dacă sînt dizolvate în apă sau în ulei în concentraţii suficient de mari, lipidele polare formează micelii în mod spontan. Atunci cînd întîlnesc o interfaţă ulei-apă sau aer-apă, ele se concentrează la nivelul acestei interfeţe.

Scanned with OKEN Scanner

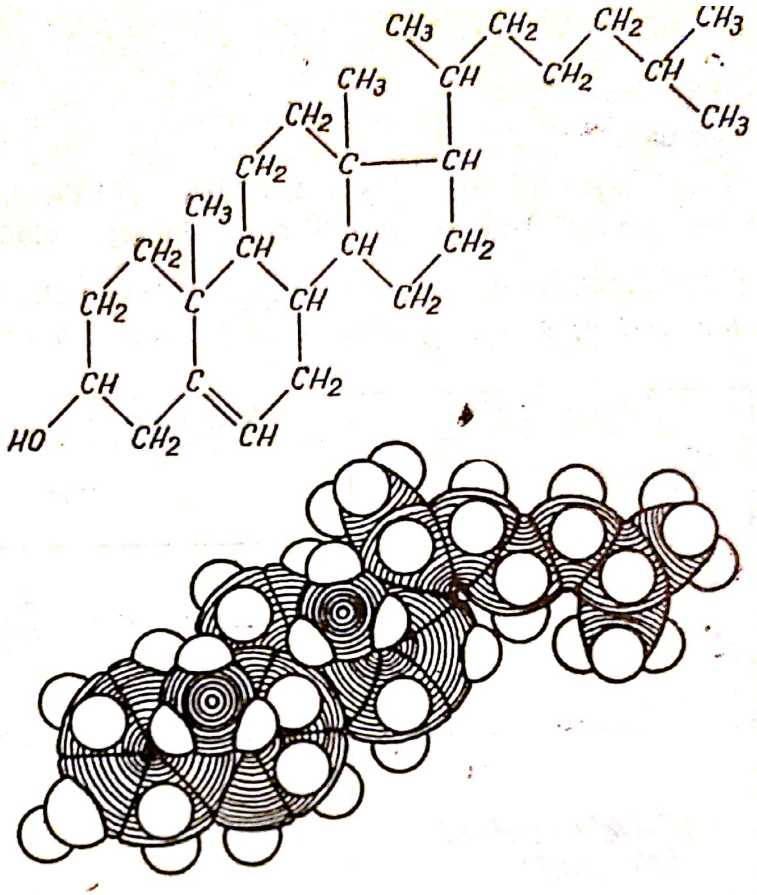


Fig. 6.3. Formula chimică şi desenul unui model molecular al colesterolului.

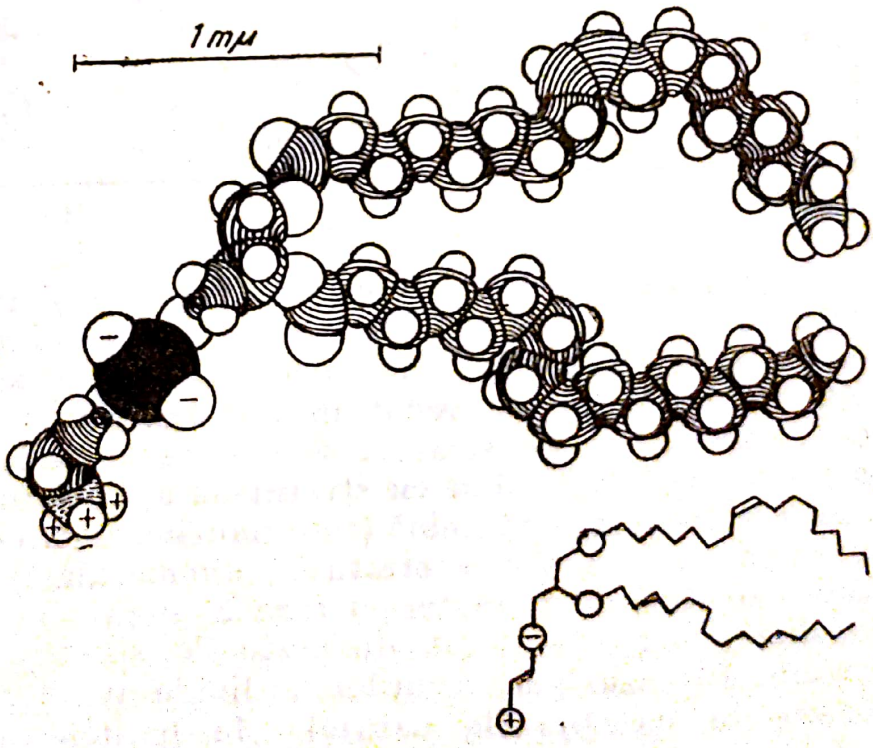


Fig. 6.4. Desenul unui model molecular al unui fosfolipid complet: o moleculă de fosfatidil-etanolamină cuprinzînd un lanţ hidrocarbonic de acid oleic şi un lanţ de acid palmitic.

A se reţine reprezentarea „stenografică" a scheletului care va fi utilizată în ilustraţia următoare:
— legături simple carbon-carbon;
= legături duble carbon — carbon;
—O grupări polare (formatoare de legături de hidrogen).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 6.3

Grupările caracteristice ale fosfolipidelor mai des întîlnite (a se reține schițele „stenografice" care vor fi utilizate și în reprezentările ulterioare):

1 — Fosfolipid; 2 — Grupare caracteristică; 3 Acid fosfatidic; 4 — Fosfatidil-etanolamină; 5 — Fosfatidil-colină (lecitină); 6 — Fosfatidil-serină.

Fosfolipid	*Grupare caracteristică*
Acid fosfatidic	$-H$ →
Fosfatidil-etanolamină	$-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H_3$ →
Fosfatidil-colină (licitină)	$-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$ →
Fosfatidil-serină	$-CH_2-CH(^+NH_3)-C(=O)-O^-$ →

În soluție apoasă, la concentrații mari și în condiții adecvate de *p*H etc., se realizează adeseori un tip și mai avantajos de miceliu, sub forma unei pelicule întinse sau a unui strat bimolecular, ca acela redat în fig. 6.6. În anumite limite de concentrație, aceste straturi se dispun la distanțe regulate în masa soluției (alternînd cu stratul de apă) și în aceste condiții sau în stare hidratată solidă (corespunzînd unei eliminări aproape complete a apei dintre straturile bimoleculare) devine posibil, prin cercetări de difracție cu raze X și prin alte tehnici, să se studieze mai amănunțit dimensiunile și structura lor moleculară. În cazul amestecurilor de lipide avînd compoziția celor găsite în membranele naturale, în limitele de temperatură

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 6.4

Lanţurile hidrocarbonice mai des întîlnite în fosfolipide

Saturat	palmitic	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
	stearic	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
Nesaturat	oleic	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
	linoleic	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
	linolenic	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
	arahidonic	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$

20—37 °C, straturile bimoleculare sînt probabil straturi lichide. Lanţurile hidrocarbonice au acelaşi gen de flexibilitate ca şi lanţurile peptidice (cap. 3 fig. 3.7). Într-un strat lipidic lichid, aceste lanţuri se află într-o agitaţie continuă, ca un coş cu şerpi animaţi de mişcări vii, deşi mişcarea fiecărei molecule va fi limitată de faptul că gruparea sa polară este nevoită să se mişte aproape numai în planul interfeţelor hidrolipidice. În fig. 6.6 s-a încercat să se sugereze natura lichidă a stratului lipidic prin aceea că lanţurile hidrocarbonice au fost reprezentate ca avînd configuraţii dezordonate.

Ocazional, ca urmare a mişcării termice întîmplătoare, capătul polar al unei molecule poate fi tras în jos printre lanţurile hidrocarbonice, îndeosebi în cazul moleculelor de colesterol cu unica lor grupare polară —OH. Capătul polar poate ieşi apoi din nou la suprafaţă, de oricare parte a stratului bimolecular, astfel încît există posibilitatea ca unele molecule să se deplaseze trecînd dintr-o parte a stratului în cealaltă.

MODELE MOLECULARE ALE STRUCTURII MEMBRANELOR DEDUSE DIN COMPOZIȚIA LOR CHIMICĂ ȘI DIN PROPRIETĂȚILE LOR DE PERMEABILITATE

Primele idei cu adevărat de amănunt asupra structurii moleculare probabile a membranelor celulare au fost bazate pe o experiență de cea mai elegantă simplitate, efectuată în 1925 de către Gortner și Grendel cu tehnici elaborate prin 1917 de Langmuir și alții.

Gortner și Grendel au extras lipidele dintr-o probă de sînge conținînd un număr cunoscut de celule și au împrăștiat aceste lipide, solvite în benzen, pe interfața apă-aer a unui vas umplut parțial cu apă. Într-o astfel de experiență, benzenul se evaporă și lasă moleculele de lipide polare împrăștiate peste întreaga suprafață. Dacă un fir de ață ținut de ambele capete este tras peste suprafața apei, pornind de la marginea vasului, acest strat de suprafață se va aduna pînă cînd, tot strîngîndu-se, va atinge o anumită limită destul de exact circumscrisă în suprafață, cînd începe să opună rezistență dacă este supus unei compresiuni suplimentare. Cînd se ajunge la acest punct, lipidele polare alcătuiesc un strat monomolecular compact, avînd lanțurile hidrocarbonice îndreptate către aer, iar grupările polare în apă. Rezistența la compresie suplimentară rezultă din faptul că o astfel de compresie trebuie fie să împingă unele lanțuri hidrocarbonice în jos, în apă, fie să determine unele grupări polare să iasă din faza apoasă.

Gortner și Grendel au măsurat suprafața stratului monomolecular compact format de eșantionul lor lipidic. Pe baza cifrelor estimative ale mărimii suprafeței fiecărei globule roșii și cunoscînd numărul de celule din proba lor, ei au calculat că totalul cantității de lipide era exact suficient pentru a forma un strat bimolecular la nivelul suprafeței celulare (adică aria monostratului împrăștiat pe apă = dublul ariei totale a celulelor). Ei au emis ipoteza că elementul de bază al structurii membranei ar putea fi reprezentat de un strat bimolecular de tipul celui reprodus în fig. 6.6.

Un strat lipidic bimolecular de acest tip ar putea, fără îndoială, să explice într-un mod satisfăcător principalele proprietăți de permeabilitate ale membranei celulare. El ar putea constitui o barieră de difuziune pentru ioni și substanțele hidrosolubile, rămînînd în același timp relativ permeabil pentru substanțele

Scanned with OKEN Scanner

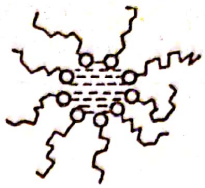


Fig. 6.5. Reprezentare schematică a unor lipide polare dispuse într-un strat monomolecular la nivelul unei interfețe ulei-apă și sub formă de micelii sferice în faza uleioasă și în cea apoasă (după Luzzati, Mustachi și Skoulios, 1958).

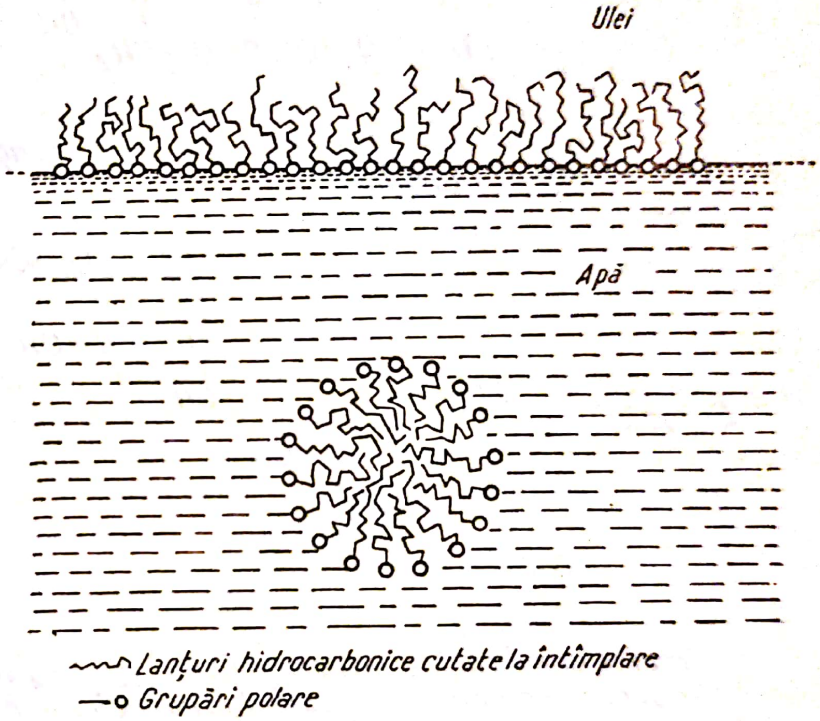
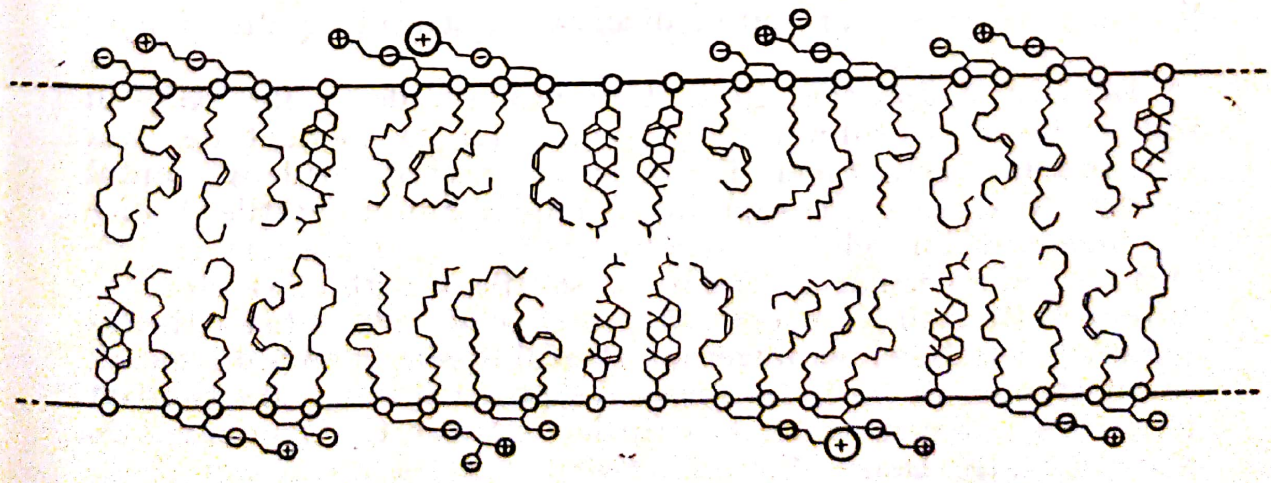


Fig. 6.6. Reprezentare schematică a unui strat bimolecular alcătuit dintr-un amestec de fosfolipide și colesterol (raport fosfolipide/colesterol 2/1).

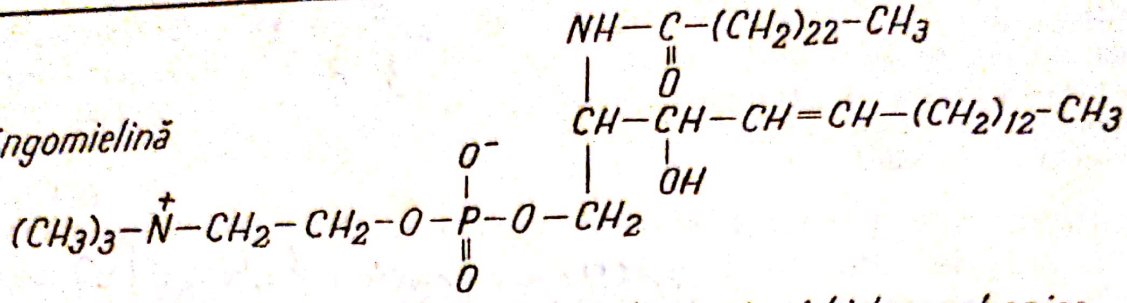
Pentru formulele și modelele moleculare complete ale moleculelor reprezentate aici în formă „stenografică", vezi fig. 6.3 și 6.4 și tabelele 6.3. și 6.4.



TABELUL 6.5

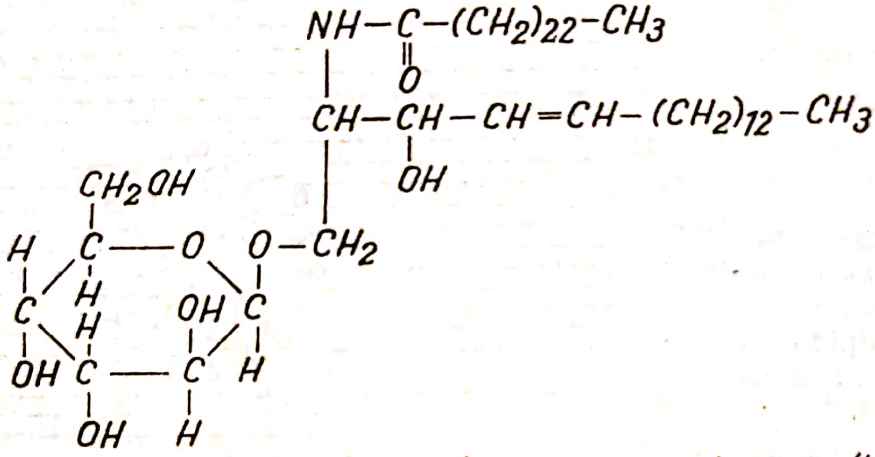
Formulele fosfolipidului sfingomielină și cerebrozidului cerasină

Sfingomielină



In locul $-(CH_2)_{22}-CH_3$ se pot găsi și alte lanțuri hidrocarbonice, de ex. cele din Tabelul 6.4.

Cerazină



In alte cerebrozide, în locul $=(CH_2)_{22}-CH_3$ se pot găsi alte lanțuri hidrocarbonice și hidroxil-hidrocarbonice.

liposolubile, care s-ar putea dizolva în stratul lipidic și apoi ar difuza prin el.

Danielli și Dawson, în ipoteza propusă de ei în 1935, au reținut ideea stratului lipidic bimolecular ca element de bază al structurii membranei. Ei au scos totuși în evidență faptul că, date fiind tensiunile superficiale reduse și proprietățile elastice ale membranelor celulare, rezultă că pe suprafețele externe ale stratului bimolecular ar trebui să se afle adsorbite și proteine. Ulterior, Danielli a sugerat că proteina ar mai putea fi încorporată și astfel încît să întrerupă stratul lipidic în anumite locuri, formînd pori de apă mărginiți de proteină. Socotim potrivit să folosim pentru toate structurile de acest tip denumirea de structuri „tip Danielli".

Scanned with OKEN Scanner

Danielli a emis ipoteza că primul strat de proteină adsorbit de stratul lipidic bimolecular ar putea fi desfășurat, întrucît se știe că proteinele se desfășoară la nivelul unei interfețe dintre apă și *lipidele nepolare* (fig. 3.17). Totuși, la suprafața unui strat bimolecular de lipide *polare*, avînd moleculele orientate cu grupările polare înspre faza apoasă, acest tip de desfășurare nu este cîtuși de puțin obligatoriu. În unul dintre paragrafele următoare vom examina mai în amănunțime interacțiunile dintre proteine și lipidele polare și vom vedea că este extrem de greu de făcut speculații bazate pe proprietățile cunoscute ale proteinelor și lipidelor polare. Nu știm în ce măsură, în interacțiunea cu lipidele polare, va fi modificată structura terțiară sau cuaternară a proteinelor. De asemenea, efectele hidrofobe care determină formarea unui strat bimolecular de lipide în absența proteinelor pot fi total modificate atunci cînd este prezentă o proteină.

Studiul capacității electrice a membranelor celulare pare, la prima vedere, să aducă argumente în sprijinul structurii de tip Danielli. Această capacitate a fost determinată pentru globulele roșii, ouăle de arici de mare și bacterii pe baza constantelor dielectrice ale suspensiilor respective, iar pentru celulele vegetale, musculare și nervoase, prin măsurători directe cu electrozi. Capacitatea membranelor la frecvențe înalte este surprinzător de asemănătoare la toate aceste celule, valoarea ei fiind de aproximativ 1 microfarad/cm². (Capacitatea la frecvențe joase prezintă variații mai mari, dar valoarea la frecvențe înalte este cea care are semnificație mai mare în ceea ce privește structura de bază a membranei. O capacitate de 1 microfarad/cm² corespunde cu capacitatea unui strat de lipide (avînd constanta dielectrică 3) gros de aproximativ 3 mμ. (Capacitatea în microfarazi/cm² $= \frac{100}{36\pi} \frac{\text{constanta dielectrică}}{\text{grosimea în m}\mu}$.) Aceasta este exact valoarea la care ne-am aștepta în cazul unei structuri de tip Danielli, presupunînd că porii de proteină, dacă există, nu sînt prea numeroși sau prea mari. Din nefericire însă, măsurătorile de capacitate stabilesc numai o *limită inferioară* a grosimii membranei. Ele ar fi în egală măsură compatibile cu o structură alcătuită dintr-un amestec de lipide și proteine, avînd o grosime de 3x mμ și o constantă dielectrică de 3x, x rămînînd o canti-

tate complet necunoscută. Importanţa măsurătorilor de capacitate rezidă în primul rînd în faptul că stabilesc o limită inferioară precisă pentru grosimea membranelor, şi anume aproximativ 2 mμ (întrucît constanta dielectrică a materialului respectiv nu poate fi mai mică de cca. 2). Pentru aceste celule (globule roşii, ouă de arici de mare, bacterii, celule nervoase, musculare, vegetale), datele amintite reprezintă dovezi foarte convingătoare, deosebite de cele furnizate de cercetările de permeabilitate, în sprijinul faptului că la periferia celulei există o structură membranoasă definită, constituită dintr-un material cu o constantă dielectrică joasă şi cu o conductibilitate ionică scăzută în comparaţie cu citoplasma sau cu lichidul extracelular.

DATE FURNIZATE DE MICROSCOPIA ELECTRONICĂ ASUPRA STRUCTURII MEMBRANELOR CITOPLASMATICE

Putem revedea acum datele din care rezultă că la majoritatea, dacă nu chiar la toate celulele, principalele proprietăţi de permeabilitate ale membranelor au la bază un strat de lipoproteine cu o grosime mai mică de 10 mμ, strat care apare pe microelectronografii sub forma unui profil tipic, format din două linii întunecate cu o grosime de 2—3 mμ, separate între ele printr-un spaţiu clar, care în mod normal este lat de 2—3 mμ, uneori însă mai îngust (ca la membranele citoplasmatice ale anumitor bacterii). În acelaşi timp putem să ne ocupăm de datele pe care progresele recente în domeniul microscopiei electronice ni le pun la îndemînă referitor la dispoziţia lipidelor şi proteinelor din acest strat.

O primă serie de date provin din studiul globulelor roşii şi al „fantomelor" obţinute din astfel de celule. Proprietăţile „fantomelor" celulare depind foarte mult de modul în care acestea au fost preparate: cîteva şocuri osmotice blînde în soluţii de tonicitate descrescîndă îndepărtează *majoritatea* hemoglobinei din celule, mecanismele de transport al Na^+ şi K^+ din membrană rămînînd active. Un număr mai mare de şocuri, urmate de spălări abundente, menite să elimine toată hemoglobina, produc modificări mai severe ale proprietăţilor de permeabilitate ale membranei. Un astfel de tratament îndepărtează, probabil, o cantitate apreciabilă din proteinele membranei, precum şi o parte din lipide. Pentru „fantome" celulare care au fost abun-

Scanned with OKEN Scanner

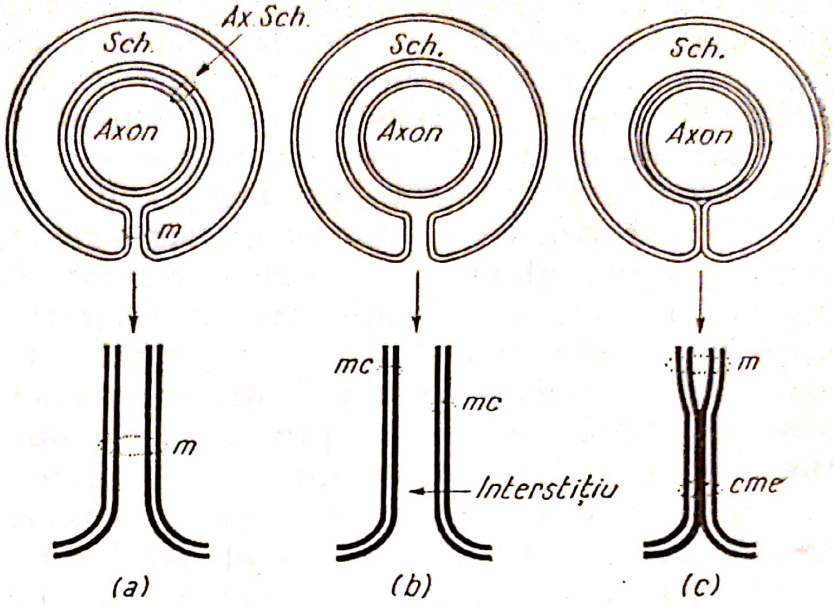


Fig. 6.7. Schema aspectului electronoptic al fibrelor nervoase nemielinizate: *a*) preparat normal; *b*) preparat menținut înainte de fixare în soluții hipotonice; *c*) menținut înainte de fixare în soluții hipertonice.

(Sch. = celulă Schwann; ax. Sch. = interstițiul dintre axon și membranele citoplasmatice ale celulelor Schwann; *m* = mezaxon; *mc* = membrana citoplasmatică a celulei Schwann; *cme* = zonă de contact între porțiunile alăturate ale suprafețelor externe ale membranei citoplasmatice a celulei Schwann (după Robertson, 1959).

dent spălate, atît determinările chimice de proteine și lipide în membrana ,,fantomei'', cît și cercetările de microscopie electronică întreprinse de Hillier și Hoffman (vezi mai jos) apreciază grosimea membranei ,,fantomelor'' la 5 mμ. Microelectronografii ale unor globule roșii fixate cu osmiu arată o membrană periferică similară cu cea a altor celule, groasă de aproximativ 8 mμ. Admițînd o eventuală pierdere de substanță în cursul preparării ,,fantomelor'' celulare, pare judicios să se presupună că membrana ,,fantomei'' provine din materialul acestui strat gros de 8 mμ.

O altă serie de date este bazată pe studierea unor nervi în soluții hipotonice și hipertonice. La nervii fixați în soluții hipotonice, spațiul dintre axon și membranele celulelor Schwann (cap. 5) apare lărgit; după fixare în soluții hipertonice, el este redus (fig. 6.7). Aceste rezultate arată că spațiul de 10—20 mμ reprezintă un canal în lungul căruia poate avea loc o difuziune de apă și că, *in vivo*, foițele de material electronopac sînt relativ impermeabile față de apă.

Un alt rezultat dintre cele mai importante, obținut cu ajutorul microscopiei electronice, constă în demonstrarea faptului că teaca de mielină este constituită din material aparținînd membranelor celulelor Schwann (cap. 5). Aceasta reprezintă o

dovadă directă a faptului că stratul osmiofil vizibil la suprafaţa celulelor Schwann este un strat de lipoproteină. În plus, cercetările detaliate asupra compoziţiei şi structurii tecii de mielină aduc nemijlocit contribuţii revelatoare pentru studiul membranelor.

Teaca de mielină este un element cu o structură stratificată şi deci poate fi studiată prin metoda de difracţie cu raze X (fig. 3.14). Întrucît spectrele de difracţie cu raze X pot fi determinate pe nervul proaspăt, umed, nefixat, dimensiunile lamelelor de mielină pot fi apreciate comparativ pe microelectronografii şi pe nervul proaspăt izolat. La nervul de broască, dimensiunii de 7—8 mμ evidenţiate pe microelectronografii îi corespunde, pe preparatul proaspăt, o dimensiune de 9 mμ. Modificările produse de tehnicile de pregătire a unui preparat pentru microscopia electronică pot fi urmărite prin difracţia cu raze X; în cursul fixării şi al deshidratării, în soluţiile de alcool are loc o micşorare de volum considerabilă (9 mμ → 6,5 mμ), datorită pierderii de apă şi probabil extragerii de lipide. În cursul impregnării structurilor deshidratate cu monomerul metacrilic şi al polimerizării acestuia, se reajunge practic la dimensiunile originale (6,5 → 8 mμ), probabil deoarece moleculele de metacrilat pătrund în structura membranei înlocuind moleculele lipidice extrase. Grosimea *in vivo* a membranelor, care pe microelectronografii apar ca profile de 7—8 mμ, ar putea fi de aceea mai apropiată de 9 mμ.

Detaliile spectrului de difracţie cu raze X caracteristic mielinei au fost studiate de către Finean. Cu puţin timp înainte ca microscopia electronică să fi evidenţiat legătura dintre lamelele de mielină şi membrana celulei Schwann, el a formulat, pe baza indicaţiilor furnizate de difracţia cu raze X, o ipoteză asupra structurii lamelelor de mielină similară în esenţă cu aceea propusă de Danielli pentru membranele celulare. La prima vedere, acest lucru pare un argument valoros în sprijinul structurii Danielli; din nefericire însă, supoziţiile lui Finean privitoare la dispoziţia detaliată a moleculelor în structura mielinei sînt practic tot atît de speculative ca şi acelea ale lui Danielli; ba, mai mult, este vorba de acelaşi gen de speculaţii bazate pe compoziţia chimică şi pe cunoscuta dispoziţie lamelară a lipidelor, adoptată de acestea în absenţa proteinelor. După cum am menţionat, astfel de speculaţii au un caracter foarte hazardat.

Într-adevăr, teaca de mielină nu furnizează spectre foarte

Scanned with OKEN Scanner

detaliate de difracţie cu raze X (fig. 3.14). Principalele rezultate directe ale cercetărilor iniţiale de difracţie cu raze X, pe care se bazează modelul lui Finean, se referă la grosimea lamelelor şi la o anumită periodicitate în structura acestora, sugerînd prezenţa unor lanţuri hidrocarbonice strîns alăturate, dispuse predominant perpendicular faţă de planul lamelelor. Cercetările cu raze X confirmă în această privinţă o concluzie la care se ajunsese încă înainte, prin cercetări asupra nervului mielinizat efectuate în lumină polarizată. În ultima vreme Finean, perfecţionînd tehnica de cercetare prin difracţie cu raze X, a reuşit să evidenţieze în fiecare lamelă două zone principale de mare densitate electronică. Distingerea acestor zone individualizate sugerează că ele reprezintă grupările fosfatice electrondense ale unui strat lipidic bimolecular.

În sfîrşit, ne vom ocupa de o altă serie de date dintre cele mai importante, rezultate din cercetarea la microscopul electronic a unor pelicule pure de fosfolipide şi lipoproteine preparate şi fixate *in vitro*. Miceliile lamelare de fosfolipide pure dau — după fixare cu osmiu sau permangant, incluzionare şi secţionare fină — imagini electronoptice similare în esenţă cu cele ale membranelor aflate la periferia celulelor. Adsorbţia *in vitro*, înainte de fixare, a unor proteine pe aceste lamele de fosfolipide pure, duce la o uşoară îngroşare a liniilor externe vizibile pe microelectronografii (fig. 6.8). Peliculele subţiri alcătuite exclusiv din proteină apar ca o singură linie densă.

Studii chimice au arătat că tetraoxidul de osmiu intră în interacţiune cu o diversitate de grupări ale proteinelor, ca şi cu grupările polare ale fosfolipidelor şi cu dublele legături ale lanţurilor hidrocarbonice nesaturate (tabelul 6.4). Permanganatul de potasiu este şi el un „colorant electronic" relativ nespecific, deşi pare să reacţioneze mai puţin puternic cu proteinele decît tetraoxidul de osmiu. Nu putem preciza pe baza acestor studi care componentă a unei structuri lipoproteice va fi mai puternic osmiofilă. Ştim cu oarecare certitudine că în lamelele de fosfolipide pure moleculele trebuie să fie orientate cu grupările lor polare înspre faza apoasă. Judecînd după imaginile electronoptice ale unor astfel de lamele, precum şi după cercetări efectuate pe alte sisteme hidrolipidice, s-ar părea că grupările polare furnizează un număr mai mare de suporturi de fixare a osmiului decît lanţurile hidrocarbonice. Acest lucru nu este

Scanned with OKEN Scanner

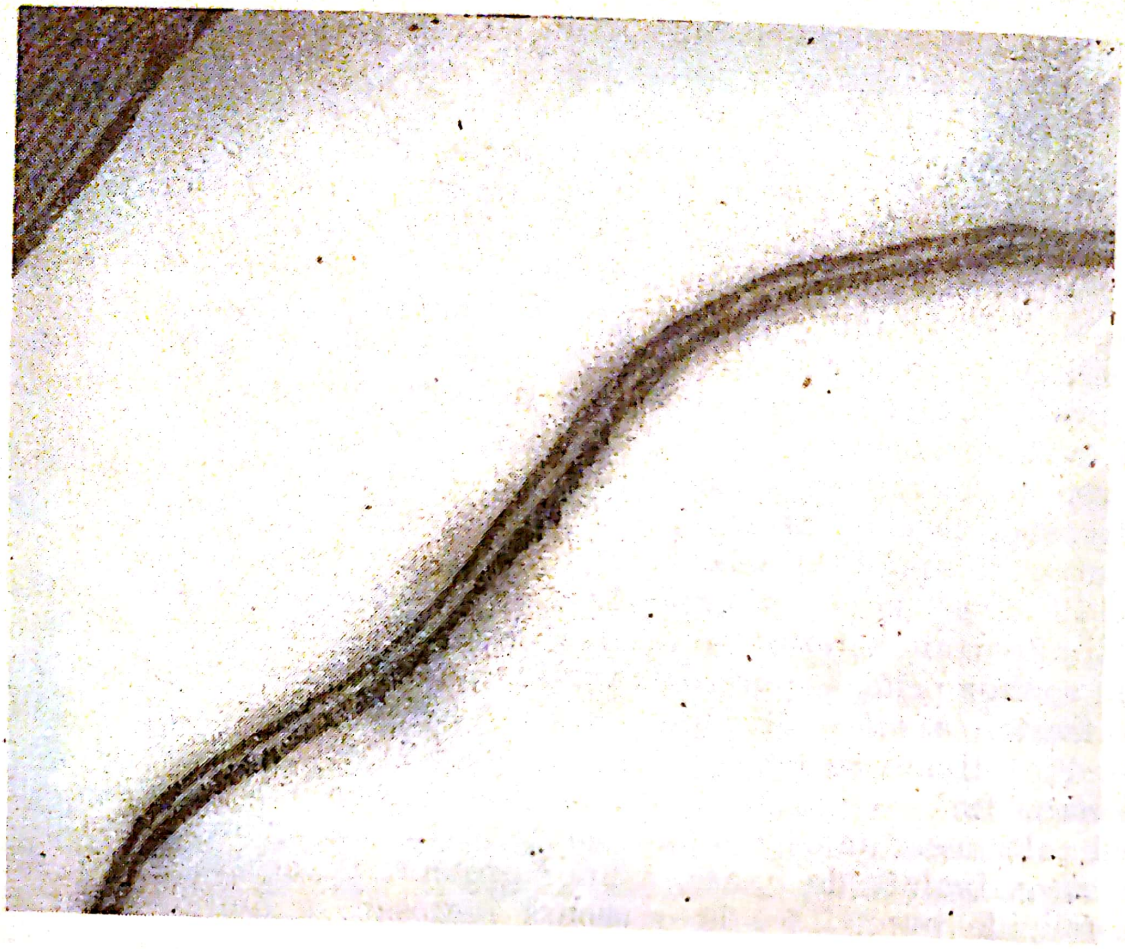


Fig. 6.8. Microelectronografie a celei mai fine structuri lamelare vizibile în suspensii apoase de fosfolipide şi proteine, după fixare cu osmiu (mărire 500 000 x) (după Stoeckenius, 1962).

însă cîtuşi de puţin cert. În cursul fixării s-ar putea ajunge la o oarecare reorientare a lanţurilor hidrocarbonice, care ar aduce grupările lor nesaturate la suprafaţa lamelei, osmiul formînd interconexiuni între ele, precum şi între grupările polare, la nivelul interfeţei cu mediul apos. Într-adevăr, dacă reacţia cu osmiul are loc predominant la nivelul interfeţei cu apa, atunci un strat lipoproteic va apărea cu acelaşi profil, oricare ar fi dispoziţia lipidelor şi proteinelor în interiorul stratului.

Putem rezuma datele analizate în acest paragraf după cum urmează: argumentele care ne fac să credem că membrana de 7—8 mμ, vizibilă pe microelectronografii la periferia celulelor, este un strat de lipoproteină şi să presupunem că acest strat reprezintă principala barieră în calea difuziunii libere spre inte-

Scanned with OKEN Scanner

riorul şi în afara celulei par să fie destul de convingătoare. Grosimea acestui strat *in vivo*, în stare hidratată, ar putea fi de 9 mμ. Modul cum sînt dispuse proteinele şi lipidele în acest strat este mult mai puţin lămurit. Asemănarea dintre aspectul electronoptic al membranelor citoplasmatice celulare şi cel al unor lamele bimoleculare de fosfolipide pe care se află adsorbită o proteină poate fi considerată drept un argument pozitiv în sprijinul a ceea ce am numit o structură de tip Danielli, zona clară dintre liniile întunecate vizibile pe microelectronografii corespunzînd unui material de natură predominant hidrocarbonică. În cazul tecii de mielină cel puţin, precum şi în miceliile fosfolipidice pure, lanţurile hidrocarbonice sînt orientatepredominant perpendicular în raport cu suprafaţa lamelelor.

Cercetările de microscopie electronică, precum şi cele de difracţie cu raze X, efectuate asupra mielinei, nu exclud, desigur, posibilitatea unor variante ale structurii de tip Danielli, de exemplu, o structură în care zone mici de proteină pură întrerup o foiţă, altminteri continuă, de lipide sau o membrană asemănătoare unei reţele formate din fibrile de proteină cu plăci lipidice dispuse în ochiurile acestei reţele. Atît la cercetarea spectrelor de difracţie cu raze X date de mielină, cît şi pe microelectronografii ale unor secţiuni fine noi studiem un efect produs de acele componente ale membranei care sînt aranjate într-un mod mai regulat (pentru înţelegerea limitărilor de ordin tehnic ale studiilor de difracţie cu raze X, vezi anexa 1). Prin aceste metode nu aflăm nimic despre compuşii situaţi în mod mai neregulat, care ar putea reprezenta pînă la 30% din structura membranelor.

În acest context ar putea fi menţionat şi un alt tip de cercetări de microscopie electronică, şi anume examinarea directă de către Hillier şi Hoffman a unor „fantome" de globule roşii împrăştiate pe grila microscopului electronic. Ei au constatat că membrana „fantomei" celulare apare constituită din plăci lipidice cu un diametru de 30—40 mμ şi groase de 3 mμ, ataşate de suprafaţa externă a unei reţele strîns împîslite de fibrile proteice, ce are o grosime de 2 mμ. Aceste plăci ar putea proveni dintr-un strat lipidic continuu, formîndu-se în cursul hemolizei globulelor roşii; este de asemenea posibil, în lumina datelor actuale, ca structura evidenţiată de Hillier şi Hoffman să fie adevărata structură a membranei citoplasmatice, deşi în celula intactă este de bănuit existenţa unui strat suplimentar extern

Scanned with OKEN Scanner

de proteină mai puţin ferm legată, pe care ei l-au îndepărtat la spălarea „fantomelor" celulare. O structură de acest tip ar putea fi tot atît de compatibilă cu aspectul electronoptic pe secţiuni fine al membranelor citoplasmatice ca şi o structură avînd la bază un strat lipidic continuu bimolecular.

Vom încheia acest paragraf cu cîteva remarci succinte asupra compoziţiei membranelor celulare interne. Pe microelectronografii, membranele interne sînt mai subţiri decît membranele citoplasmatice şi uneori ele apar doar sub forma unor linii dense, groase de 4—6 mμ. Acestea ar putea corespunde unor membrane lipoproteice, unor foiţe de proteină pură sau pur şi simplu unor interfeţe la nivelul cărora nu există o membrană, ci se produce doar o condensare de material osmiofil în cursul fixării. Totuşi, faptul că atît fracţiunile celulare mitocondriale, cît şi cele microzomale sînt bogate în fosfolipide sugerează că ceea ce se vede la microscopul electronic în aceste condiţii sînt membrane lipoproteice intracelulare. Comportarea mitocondriilor (de exemplu, umflarea lor în soluţii hipotonice) concordă, de asemenea, cu supoziţia că ele sînt înconjurate de membrane. Compoziţia lipidelor din fracţiunea mitocondrială vizibilă la microscopul electronic este foarte asemănătoare cu cea a membranelor citoplasmatice (tabelul 6.2).

INTERACŢIUNEA DINTRE PROTEINE ŞI LIPIDE

Deşi dovezile că membranele citoplasmatice corespund structurii de tip Danielli nu sînt cîtuşi de puţin certe, ele au totuşi o bază suficient de solidă pentru a îndreptăţi punerea următoarelor întrebări: care este dispoziţia cea mai probabilă a proteinelor şi lipidelor într-o structură de acest gen? Pot fi explicate oare *toate* proprietăţile de permeabilitate ale membranelor citoplasmatice pe baza structurii de tip Danielli? Putem oare, pe baza unor cercetări amănunţite de permeabilitate, să decidem dacă este mai probabil ca structura membranelor să includă un strat lipidic continuu (cum a presupus Danielli iniţial) sau mai degrabă să conţină canale de apă mărginite de proteine (ca în ipoteza ulterioară a aceluiaşi autor)?

Interacţiunile posibile dintre proteine şi lipidele polare în cadrul unui strat lipoproteic sînt ilustrate în fig. 6.9 pînă la

Scanned with OKEN Scanner

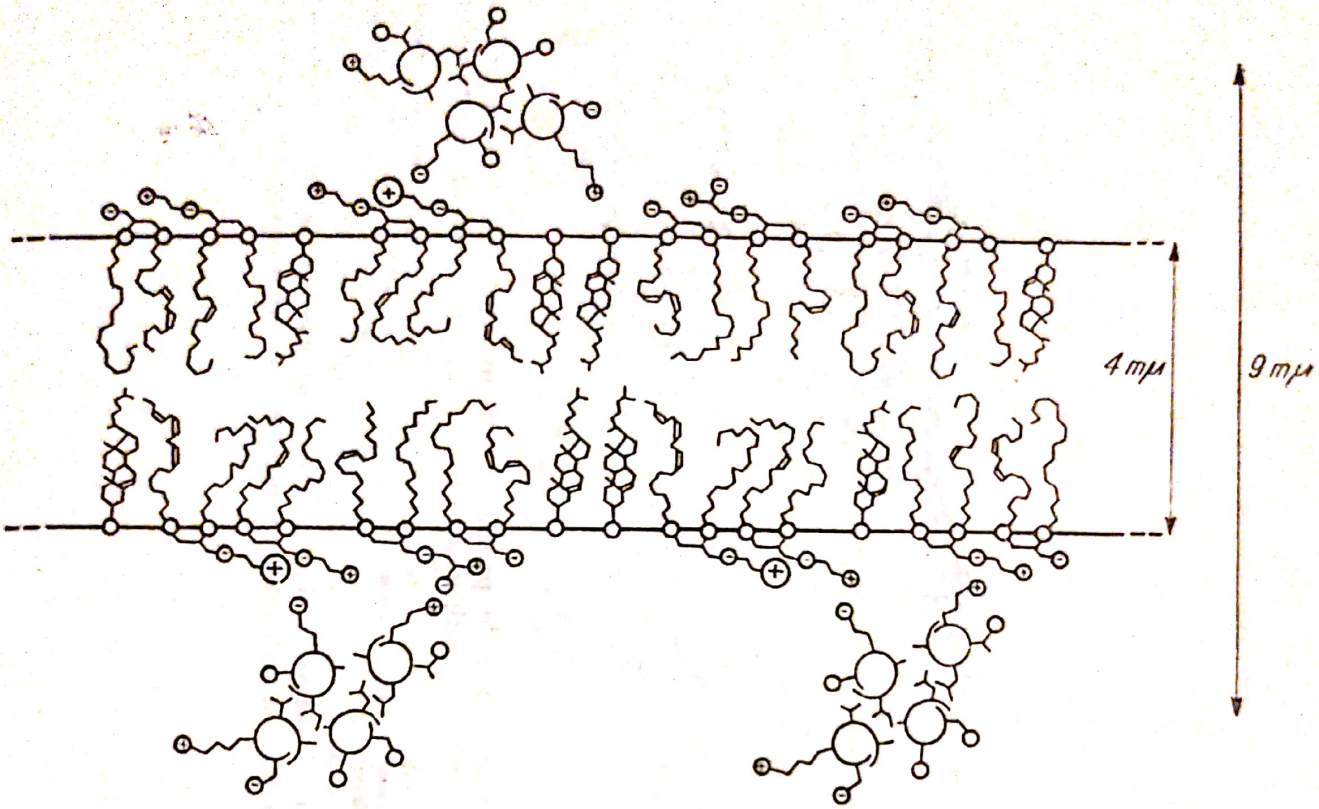


Fig. 6.9. Reprezentare schematică a adsorbției unei molecule globulare de proteină pe un strat bimolecular de lipide polare, fără modificarea structurii secundare sau terțiare a proteinei.

Stratul bimolecular este reprezentat ca în fig. 6.6. Proteina globulară este reprezentată ca în fig. 3.17. Atracția electrostatică dintre grupările cu sarcină opusă pare să joace un anumit rol în legarea proteinei de grupările polare lipidice, așa cum este indicat în schema de față. Ionii pozitivi bivalenți pot lega și ei grupări cu sarcină negativă.

6.11. În primul rînd, există posibilitatea adsorbirii unor molecule de proteină pe un strat bimolecular de lipide polare, fără vreo modificare în structura moleculelor de proteină (fig. 6.9). În al doilea rînd, există posibilitatea (nefigurată schematic) ca o proteină să fie încorporată în suprafața stratului bimolecular, cu o oarecare desfacere a structurii cuaternare și terțiare. O enzimă încorporată în acest mod poate păstra în suficientă măsură structura tridimensională și deci activitatea ei enzimatică să nu fie decît puțin modificată în urma încorporării ei în membrană.

A treia posibilitate este aceea ca proteina să fie încorporată în membrană, cu pierderea totală a structurii ei secundare și a celei de ordin superior, astfel încît lanțurile peptidice se desfășoară liber printre grupările polare ale fosfolipidelor, cu o

Scanned with OKEN Scanner

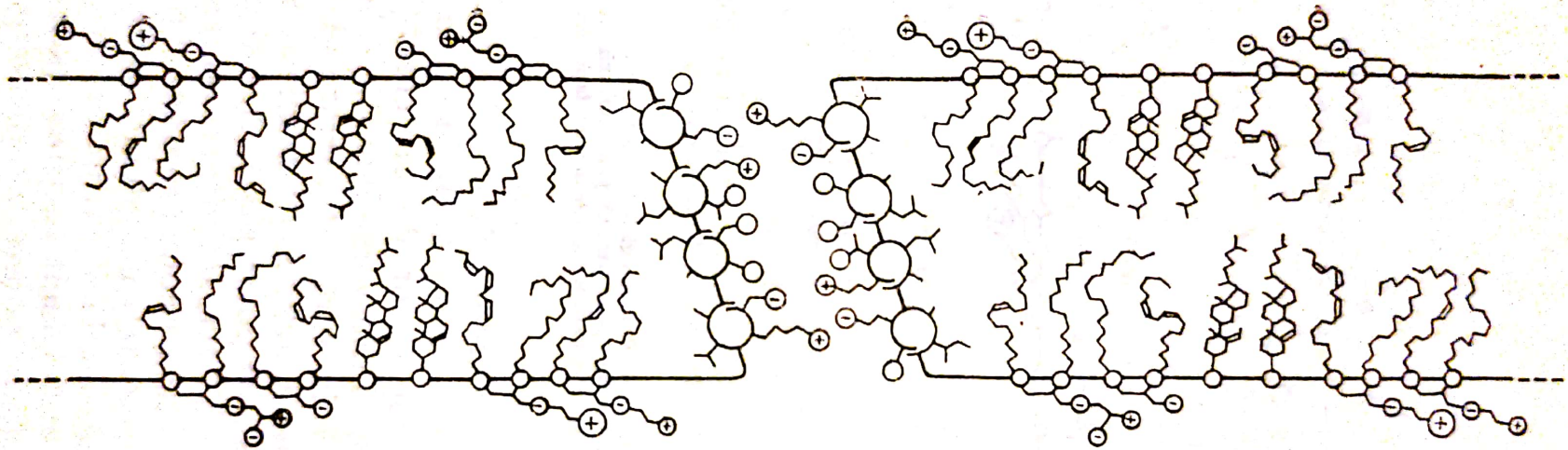


Fig. 6.10. Reprezentare schematică a încorporării unei molecule de proteină într-un strat bimolecular de lipide polare, cu formarea unui canal de apă de-a curmezişul stratului, mărginit de grupări polare ale proteinelor.

Se presupune că proteina a suferit o oarecare modificare a structurii sale secundare şi terţiare, în sensul unei desfăşurări, necesară pentru a stabiliza interfeţele hidro-hidrocarbonice la nivelul spărturilor produse în stratul bimolecular. De aceea, moleculele de proteină sînt reprezentate în forma lor desfăşurată, conform fig. 3.17. Stratul bimolecular de lipide polare este reprezentat ca în fig. 6.6. De notat interacţiunea dintre grupările lanţurilor proteice laterale cu încărcătură opusă, care tinde să reducă porul dintre grupările proteice la o serie de fisuri înguste, pline cu apă. Ionii pozitivi bivalenţi (de exemplu, Ca^{++}) pot lega şi ei grupări cu sarcină negativă. Este de presupus că o concentraţie scăzută de ioni de Ca^{++} face ca structura porului să devină mai laxă, mărind permeabilitatea membranei pentru apă şi ioni.

Scanned with OKEN Scanner

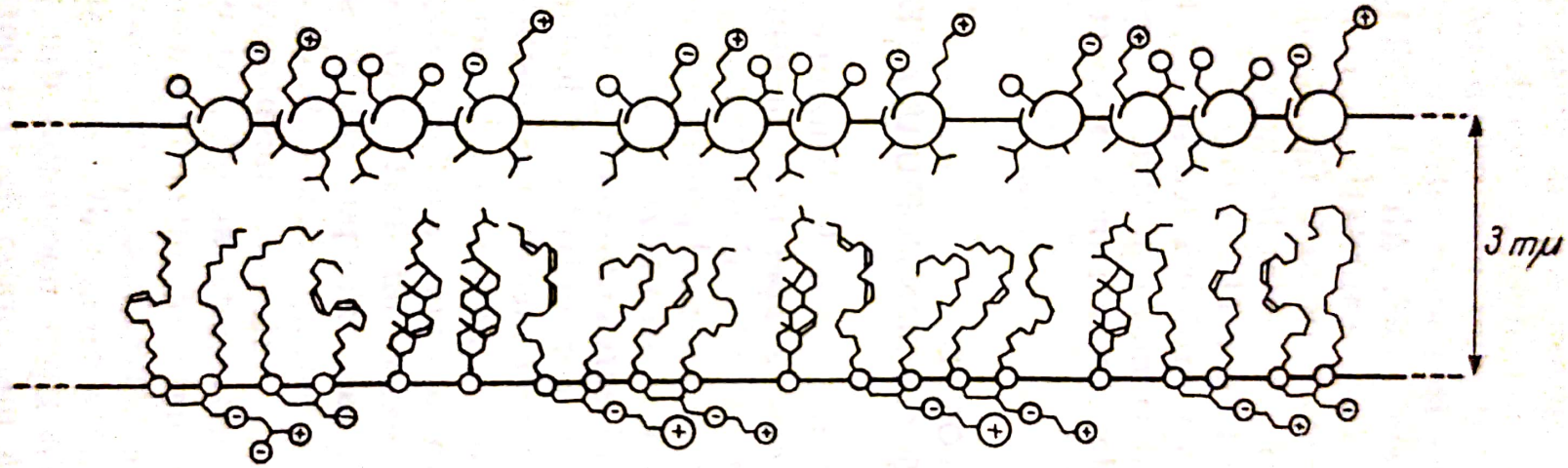


Fig. 6.11. Reprezentare schematică a desfăşurării moleculelor de proteină, pentru a stabiliza interfaţa hidro-hidrocarbonică de partea nepolară a unui strat monomolecular de lipide polare.

Proteina desfăşurată este reprezentată ca în fig. 3.17 şi 6.10. Stratul unic de lipide polare este reprezentat de unul din straturile din fig. 6.6. Modalităţile de aranjare a moleculelor din fig. 6.6, 6.10 şi 6.11 se bazează toate pe acelaşi principiu: grupările hidrocarbonice se alătură astfel încît exclud, în mare măsură, apa din regiunile ce sînt mărginite din toate părţile de grupări polare în contact cu faza apoasă. Deşi nefigurat în desene, este de aşteptat ca o mică cantitate de apă (sub formă de molecule izolate sau de cîteva molecule unite prin legături de hidrogen) să fie dizolvată în faza hidrocarbonică.

Scanned with OKEN Scanner

formă ce se modifică continuu și la întîmplare, catenele lor laterale hidrocarbonice fiind orientate înspre lipide, iar catenele laterale polare înspre faza apoasă. Este de presupus că în această situație proteinele nu vor mai avea activitate enzimatică și că probabil nu vor putea îndeplini nici vreun rol funcțional în transportul activ. Ele ar putea avea totuși un rol important în stabilizarea structurii membranei. Alte posibilități sînt reprezentate de încorporarea unor cantități de proteină, suficient de mari pentru a forma canale de apă (fig. 6.10), și stabilizarea de către o proteină a unui monostrat lipidic (fig. 6.11). În situațiile schematizate în fig. 6.10 și 6.11 există totdeauna posibilitatea unei adsorbții adiționale de proteină (ca în fig. 6.9) și, de asemenea, aceea a unei pierderi mai complete a structurii proteice secundare decît este redat în schemele respective.

MECANISMELE MOLECULARE POSIBILE ALE DIFUZIUNII FAVORIZATE ȘI ALE TRANSPORTULUI ACTIV

Analizînd în amănunt procesele de difuziune favorizată, de transport activ și de trecere a apei prin membrane, se ridică următoarele probleme importante. Cum traversează membrana ionii și substanțele dizolvate, a căror liposolubilitate este redusă? Care este modul în care activitatea enzimatică și scindarea ATP ar putea interveni în deplasarea moleculelor mici și a ionilor împotriva unor gradienți de concentrație și de potențial termodinamic? Există cel puțin trei mecanisme posibile care să permită o traversare destul de rapidă a membranei de către substanțele dizolvate care au o liposolubilitate scăzută: 1) S-ar putea ca în membrană să existe un strat lipidic continuu și ca orice difuziune favorizată sau transport activ să se realizeze prin legarea ionului sau a substanței dizolvate de anumiți transportori liposolubili; 2) S-ar putea ca membrana să fie străbătută de canale de apă mărginite de grupări polare proteice sau fosfolipidice. Aceste canale ar putea fi permanente sau ar putea avea doar o existență trecătoare, de exemplu, în cursul deplasării unui potențial de acțiune; 3) S-ar putea forma mici pungi umplute cu apă, de tipul miceliului din partea de sus a fig. 6.5, care traversează membrana dintr-o parte în cealaltă. Aceasta ar reprezenta deci un fel de pinocitoză moleculară!

Scanned with OKEN Scanner

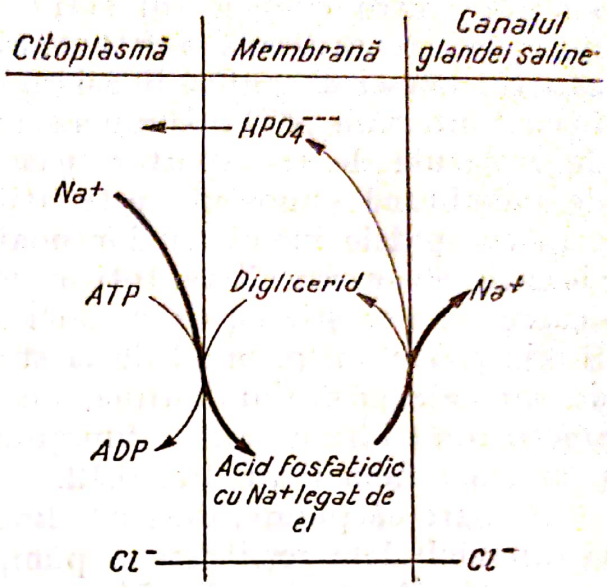


Fig. 6.12. Schema lui Hokin şi Hokin, ilustrînd rolul posibil al acidului fosfatidic ca transportor de sodiu în procesul de secreţie a clorurii de sodiu de către glandele secretorii de sare ale păsărilor marine.

Schema presupune că grupul polar cu sarcină negativă al acidului fosfatidic leagă un ion de sodiu pentru a forma complexe neutre electric cu o liposolubilitate suficientă pentru a străbate membrane. Se presupune, de asemenea, că o enzimă aflată la nivelul suprafeţei externe converteşte acidul fosfatidic într-un diglicerid care se deplasează înapoi prin membrană, de data aceasta fără sodiu. O enzimă internă din zona periferică refosforilează digliceridul în acid fosfatidic în interacţiune cu ATP (după Hokin şi Hokin, 1960). Date mai recente ale lui Hokin şi Hokin au determinat pe aceşti cercetători să se întrebe dacă mecanismul pe care l-au studiat este într-adevăr atît de simplu ca cel reprezentat în această figură. Ei au emis ipoteza că transportorul ar fi un complex lipoproteic, constituit din acid fosfatidic şi proteină.

Transportorii oferă explicaţia cea mai simplă pentru unele dintre procesele de difuziune favorizată. De exemplu, în cazul pătrunderii glucozei în globulele roşii provenite de la om, s-a observat că între viteza de intrare în hematii şi diferenţa de concentraţie nu există o corelaţie liniară, aşa cum se întîmplă în difuziunea simplă. Creşterea peste o anumită limită a diferenţei de concentraţie dintre citoplasmă şi mediul extracelular nu duce şi la o creştere corespunzătoare a vitezei de pătrundere a glucozei. Atît acest efect de saturare, cît şi marea permeabilitate a membranei faţă de glucoză, raportată la coeficientul de partiţie, pot fi explicate dacă se admite că glucoza este transportată prin membrană de către transportori liposolubili. Combinarea cu transportorul ar avea ca urmare creşterea liposolubilităţii glucozei, şi deci mărirea coeficientului de permeabilitate. De asemenea, dacă numărul de transportori din membrană ar fi limitat, ne-am putea aştepta să se producă o saturare atunci cînd diferenţa de concentraţie este suficientă pentru a ocupa cu maximum de eficienţă toţi transportorii care duc glucoza prin membrană.

Ipoteza transportorilor oferă şi o explicaţie atrăgător de

Scanned with OKEN Scanner

simplă pentru transportul activ. Atît legarea de transportor a moleculei ce urmează a fi transportată, cît şi desfacerea ei la capătul cursei ar putea fi asigurate printr-o reacţie enzimatică în care intervine ATP. Glynn a scos în evidenţă faptul că numărul de molecule de transportor necesare pentru a explica efectele de membrană cunoscute este atît de mic, încît detectarea lor printre lipidele membranelor poate fi imposibilă prin metodele chimice obişnuite. Este totuşi posibil ca unele dintre lipidele despre care se ştie că există aici să funcţioneze ca transportori. Hokin şi Hokin, pornind de la studii asupra glandelor secretorii de sare ale păsărilor marine, au emis, de exemplu, ipoteza că acidul fosfatidic ar putea funcţiona ca transportor pentru Na^+, conform schemei din fig. 6.12.

Se pare că pompa de Na^+ din celulele musculare şi nervoase şi din globulele roşii este o pompă în dublu sens, introducînd în celulă cîte un ion de K^+ pentru fiecare ion de Na^+ scos din ea sau asigurînd o înlocuire de Na^+ prin K^+ într-un anumit raport bine determinat. Aceasta sugerează existenţa unui mecanism prin care, pe faţa interioară a membranei, un transportor este convertit din forma care leagă K^+ către o formă care leagă Na^+, pentru ca apoi să fie convertit în sens invers pe faţa externă a aceleiaşi membrane.

Trecerea prin membrane a moleculelor de apă — care, aşa cum s-a arătat într-un capitol anterior, este un proces co-operativ — reprezintă un exemplu al unui fenomen care se deosebeşte de difuziunea simplă printr-un strat lipidic, dar care nu poate fi explicat direct prin ipoteza circuitului de transportori. Un efect co-operativ asemănător se întîlneşte în cazul fluxului de ioni de K^+ prin membranele citoplasmatice ale nervilor şi muşchilor. Acest tip de efecte pot fi mai bine explicate prin admiterea existenţei porilor sau a altor mecanisme de tipul celor enumerate la punctele (2) şi (3) de la începutul acestui paragraf. Să presupunem, spre exemplu, că între moleculele de proteină încorporate în structura membranei există fisuri pline cu apă, aşa cum este schiţat în fig. 6.10. Dacă are loc o trecere efectivă a apei prin aceste fisuri, moleculele de apă vor pătrunde prin membrană cu o viteză mai mare decît dacă s-ar deplasa prin simplă difuziune în spaţiul strîmt al fisurii, în condiţiile unui echilibru osmotic. Faptul că această deplasare co-operativă a moleculelor de apă a fost pusă în evidenţă la o varietate atît

Scanned with OKEN Scanner

de mare de celule vine în sprijinul punctului de vedere conform căruia stratul lipidic al membranelor citoplasmatice nu ar fi un strat continuu, ci ar fi întrerupt din loc în loc de proteine încorporate în el, aşa cum se arată, spre exemplu, în fig. 6.10.

O direcţie de cercetare complet deosebită, care sugerează fie un asemenea mod de încorporare a proteinelor în membrane, fie că proteinele înseşi s-ar putea deplasa prin membrană acţionînd astfel ca transportori, derivă din lucrările lui Mitchell şi Moyle asupra transportului prin membranele citoplasmatice ale bacteriilor. În cazul transportului activ al fosfaţilor înspre interiorul stafilococilor aurii nu există nici un fel de dovadă că aceşti ioni ar traversa membrana citoplasmatică bacteriană prin legarea de transportori liposolubili. Mitchell şi Moyle au evidenţiat faptul că activitatea unei enzime localizate în structura membranei ar putea fi asimetrică, adică ar putea cataliza cu mai multă uşurinţă o reacţie atunci cînd unul sau mai multe substraturi ajung în contact cu regiunea activă venind dinspre o parte a membranei decît venind din partea cealaltă. În aceste condiţii, activitatea enzimatică ar putea duce direct la transportul activ al moleculelor de substrat prin regiunile proteice ale membranei.

Remanierile dispoziţiei moleculare care provoacă modificările de permeabilitate faţă de ioni ale membranelor celulelor nervoase şi musculare, fie ca urmare a unei modificări a potenţialului transmembranic (prin progresarea unui potenţial de acţiune), fie după un aport de acetilcolină (joncţiunea neuromusculară), rămîn învăluite în mister. O creştere bruscă a permeabilităţii faţă de Na^+ s-ar putea datora fie deschiderii sau formării unor pori cu permeabilitate specifică pentru Na^+, fie punerii în libertate a unor transportori de Na^+ care pînă atunci fuseseră fixaţi în structura membranei. Şi alte aspecte ale activităţii membranei citoplasmatice continuă să rămînă încă în mare măsură neexplorate. Se ştie, spre exemplu, că în cursul formării mielinei membrana citoplasmatică suferă o mare creştere în suprafaţă. Nu ştim însă dacă aceasta se produce prin depunerea de material membranos sintetizat în alte părţi ale celulei sau dacă nu cumva membrana citoplasmatică cuprinde o serie de enzime pentru sinteza de lipide şi pentru transportul activ. De asemenea, nu se cunosc factorii care determină invaginarea membranei cito-

Scanned with OKEN Scanner

plasmatice cu ocazia formării vacuolelor de pinocitoză sau coalescența ei cu vacuolele interne în cursul secreției (cap. 5).

Grupările moleculare de pe suprafața externă a celulei pot prezenta un mare grad de specificitate în cazul interacțiunii cu anticorpii și al fenomenelor de adeziune celulară din cursul embriogenezei. Nu știm dacă aceste grupări sînt localizate în special pe fața externă a membranei citoplasmatice lipoproteice sau într-un strat exterior de hidrocarbonate sau de glicoproteine (molecule mari conținînd lanțuri peptidice și glucidice). Nu știm unde sînt situate enzimele care sintetizează substanțele hidrocarbonate și alte componente ale pereților și capsulelor întîlnite la bacterii.

Membranele externe ale celulelor, pe lîngă faptul că îndeplinesc funcția de coordonare și de reglare a tot ceea ce intră și iese din celulă, reprezintă prin ele însele o varietate de componente celulare cu o intensă activitate. Înțelegerea deplină a structurii și funcțiilor membranei citoplasmatice presupune, în ultimă analiză, cunoașterea interacțiunilor dintre stratul lipoproteic descris mai sus pe de o parte și ectoplasma subiacentă, precum și straturile externe de glucide sau glicoproteine pe de altă parte.

ROLUL RETICULULUI ENDOPLASMIC ÎN CELULELE MUSCULARE

Dispunerea reticulului endoplasmic în celulele mușchilor striați a fost discutată în cap. 5. În acest paragraf vom examina datele care sugerează că acest reticul ar juca, în mușchi, rolul special de a asigura conducerea rapidă a unui impuls, sub o formă oarecare, de la membrana citoplasmatică înspre interiorul celulei. În cazul contracției unei celule musculare striate, procesul inițial constă în răspîndirea unui potențial de acțiune de-a lungul membranei citoplasmatice. Modificările de permeabilitate a membranei și deplasările de ioni ce participă la acest proces au fost analizate într-un paragraf anterior. După un interval de aproximativ 40 de milisecunde (în cazul mușchiului de broască, la 0 °C), acest proces inițial este urmat de contracția coordonată a tuturor miofibrilelor din celulă. După cum a remarcat pentru prima dată A. V. Hill, acest interval scurt este insuficient pentru

Scanned with OKEN Scanner

a permite ajungerea, prin difuziune, la miofibrilele situate în centrul unei celule cu un diametru de 30—100 μ, a vreunui ion sau a oricărei alte substanţe stimulante eliberate eventual în citoplasmă de către membrana citoplasmatică în urma trecerii prin aceasta a unui potenţial de acţiune. Este necesar deci ca în acest proces să intervină nu difuziunea, ci un alt mecanism de transmitere.

Dovezile în favoarea participării la acest proces a reticulului endoplasmic au fost furnizate de experienţele lui A. F. Huxley; cu ajutorul unor electrozi de excitaţie foarte fini, introduşi în imediata vecinătate a feţei externe a membranelor citoplasmatice ale celulelor musculare de broască sau şopîrlă, el a aplicat acestora o excitaţie cu un voltaj astfel reglat, încît să provoace o depolarizare locală a membranei fără a genera un potenţial de acţiune. În aceste condiţii, se produce o contracţie localizată, interesînd numai una sau două jumătăţi de sarcomer. În cazul muşchiului de broască, această contracţie localizată se produce cel mai uşor cînd electrozii de excitaţie sînt plasaţi în apropierea benzii *Z*, condiţie în care, la aplicarea excitaţiei minime eficiente, are loc contracţia celor două hemisarcomere aşezate de o parte şi de alta a benzii *Z*. La şopîrlă, muşchiul este cel mai sensibil la excitaţia locală atunci cînd electrodul este plasat în apropierea limitei dintre benzile *A* şi *I*, iar în acest caz în urma unei excitaţii minime nu se contractă decît un singur hemisarcomer. Rezultatele obţinute pe muşchiul de broască sînt în concordanţă cu opinia mai veche, după care banda *Z* ar putea să asigure transmiterea impulsului de la membrana citoplasmatică spre interiorul celulei; rezultatele obţinute pe muşchiul de şopîrlă sînt însă în contradicţie cu acest punct de vedere. Pe de altă parte, reticulul endoplasmic prezintă ramificaţii laterale („triade" — cap. 5) care, la muşchiul de broască, se află în zona benzilor *Z*, iar în muşchiul de şopîrlă, la întîlnirea dintre benzile *A* şi *I*. Ca atare, aceste experienţe au întărit mult probabilitatea ca reticulul endoplasmic să fie cel ce joacă acest rol de transmitere. Tot ca o dovadă în acest sens amintim dezvoltarea intensă şi specializată a reticulului în anumite celule musculare, cum ar fi cele din băşica înotătoare a peştelui marin *Opsanus tau* şi din corzile ultrasonice ale liliecilor, descrise în cap. 5, celule care răspund extrem de rapid la trecerea unui potenţial de acţiune la nivelul membranei lor citoplasmatice.

Scanned with OKEN Scanner

Există, de asemenea, dovezi în sprijinul faptului că reticulul endoplasmic participă şi la faza de relaxare a ciclului contracţie-relaxare. Un preparat de vezicule provenite din fragmentarea reticulului endoplasmic al unor celule musculare (a se compara cu fracţiunea microzomală din celulele pancreatice — cap. 5), adăugat *in vitro* peste sisteme de actină-miozină în stare de contracţie, provoacă relaxarea. (La microscopul electronic „factorul de relaxare" studiat de Marsh şi Bendall s-a dovedit a fi alcătuit tocmai din asemenea vezicule).

În cap. 5 am avut ocazia să discutăm problema dacă elementele centrale ale triadelor reticulului endoplasmic reprezintă sisteme tubulare separate (aşa cum este redat în fig. 6.13, bazată pe microelectronografii obţinute după fixare cu osmiu) sau dacă sînt în realitate invaginări ale membranei citoplasmatice existente *in vivo*. Experienţele lui A. F. Huxley pledează în favoarea faptului că atunci cînd un potenţial de acţiune se răspîndeşte de-a lungul membranei citoplasmatice, apare o oarecare perturbaţie electrică ce se împrăştie înspre interiorul celulei, urmînd calea triadelor. Dacă, într-adevăr, elementul central al fiecărei triade reprezintă o invaginare a membranei citoplasmatice, aceasta ar furniza o explicaţie simplă a răspîndirii potenţialului de acţiune înspre profunzimea celulei.

Am menţionat (într-un paragraf precedent) că trecerea unui potenţial de acţiune de-a lungul membranei citoplasmatice duce la o pătrundere a ionilor de Ca^{++} în interiorul citoplasmei. Ionii de Ca^{++} fac parte dintre substanţele care acţionează ca stimulatori ai contracţiei sistemului actino-miozină (cap. 4). Dacă perturbaţia electrică ce se răspîndeşte înspre interiorul celulei pe calea reticulului endoplasmic ar fi într-un fel oarecare echivalentă unui potenţial de acţiune, ea ar putea duce la eliberarea de ioni de Ca^{++} din reticul sau din spaţiile intrareticulare înspre citoplasma întregii celule, furnizînd astfel stimulul nemijlocit pentru contracţia sistemului actină-miozină (fig. 6.13). În cursul fazei de relaxare a activităţii musculare, ionii de Ca^{++} vor trebui în acest caz să se deplaseze din nou către sediile de legare de pe membranele reticulului endoplasmic sau să fie „pompaţi înapoi în spaţiile intrareticulare (tot aşa cum ionii de Ca^{++} trebuie să se întoarcă în membrana citoplasmatică sau să fie pompaţi afară din celulă prin această membrană în timpul fazei de repaus dintre două potenţiale de acţiune).

Scanned with OKEN Scanner

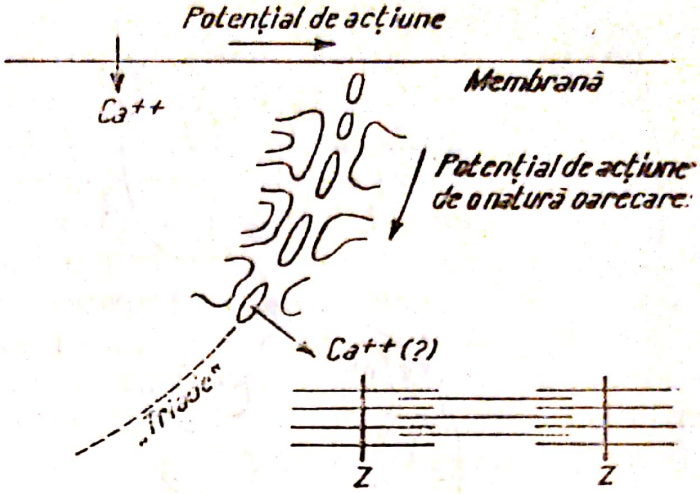


Fig. 6.13. Încercare ipotetică și provizorie de a ilustra schematic rolul posibil al reticulului endoplasmic și al ionilor de Ca^{++} în celulele mușchilor striați.

Se presupune că reticulul endoplasmic ar juca un rol în conducerea unui impuls electric prin citoplasmă, ca urmare a trecerii unui potențial de acțiune de-a lungul membranei citoplasmatice. Se presupune că trecerea atît a potențialului de acțiune, cît și a impulsului ce se deplasează de-a lungul reticulului endoplasmic eliberează în citoplasmă ioni Ca^{++}, care constituie stimulul direct necesar pentru contracția sistemului actină-miozină.

Unele dovezi în favoarea existenței unui mecanism de acest tip au fost obținute prin experiențe *in vitro*, efectuate cu preparate de vezicule provenite din fragmentarea reticulului endoplasmic al unor celule musculare. Dacă într-un asemenea preparat sînt prezenți ioni de Ca^{++} și se adaugă ATP, ionii de Ca^{++} se concentrează în vezicule, probabil ca urmare a unui proces de transport activ prin membranele veziculare. Această ipoteză, care atribuie ionilor de Ca^{++} rolul de declanșatori ai contracției musculare, este încă în mare măsură speculativă. Interacțiunile dintre reticul — sau dintre anumite porțiuni specializate ale acestuia, cum ar fi triadele — și miofibrile ar putea să fie mijlocite și de o eventuală altă substanță chimică ce stimulează contracția sistemului actină-miozină sau de un oarecare „factor de relaxare" pus în libertate de membranele reticulului endoplasmic în cursul perioadei de repaus a ciclului contracție-relaxare.

SISTEMUL ENZIMATIC ORGANIZAT AL MEMBRANELOR MITOCONDRIALE

Principalele lanțuri de reacții asigurate de sistemele enzimatice din mitocondrii au fost rezumate în fig. 2.5. Mai există și alte asemenea lanțuri care nu au fost incluse în această schemă și care fac legătura între compușii intermediari rezultați în cursul descompunerii acizilor grași și lanțul transportorilor de electroni.

Scanned with OKEN Scanner

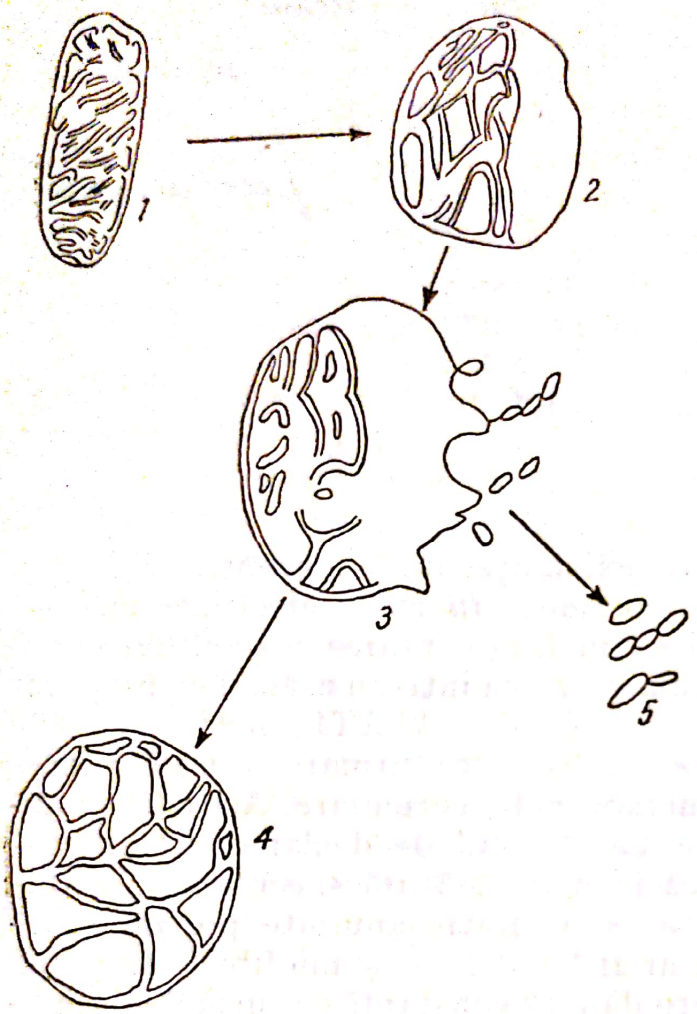


Fig. 6.14. Fragmentarea mitocondriilor:

1 — Mitocondria așa cum apare în miocardul normal sau după izolare în zaharoză, 0,88 M; 2 — Mitocondria în interiorul celulei musculare, după tratare cu zaharoză 0,25 M; 3, 4 și 5 — Forme care se găsesc în suspensiile de mitocondrii provenite din miocard, izolate în zaharoză 0,25 M. Veziculele mici (5) conțin lanțul complet de transfer de electroni, dar în aceste fragmente transferul nu mai este legat de fosforilarea ADP (după Ziegler și colab., 1958).

În reacțiile de oxidare a ciclului acizilor tricarboxilici și în cele de scindare a acizilor grași are loc îndepărtarea unor atomi de H de pe compușii intermediari; după un număr de alte etape metabolice, un număr echivalent de atomi de hidrogen se combină cu oxigenul pentru a forma apă. În aceste etape ulterioare are loc separarea nucleelor atomilor de hidrogen de electronii lor, iar acești electroni se deplasează de-a lungul unei serii de transportori: lanțul de transfer de electroni. Această deplasare este cuplată cu fosforilarea ADP în ATP și, în condiții aerobe, reprezintă principala cale prin care celula își regenerează ATP care este scindat (pînă la ADP) în cursul contracției musculare, al proceselor de transport activ și al altor reacții metabolice care necesită energie.

Scanned with OKEN Scanner

Acest sistem de fosforilare oxidativă continuă să-şi păstreze întreaga activitate *in vitro* dacă mitocondriile sînt extrase şi menţinute în medii adecvate. În mediile neadecvate, care nu permit menţinerea integrală a funcţiei mitocondriilor, se observă un paralelism interesant între pierderea funcţiei şi modificarea morfologică a acestora (fig. 6.14). Veziculele mici, provenite din mitocondrii şi care au o singură membrană de înveliş, mai sînt capabile încă să asigure transportul electronilor de-a lungul lanţului de transfer al acestora; pentru asigurarea în continuare a cuplării acestui transfer cu fosforilarea ADP, fragmentele mitocondriale trebuie să-şi păstreze însă un grad mai înalt de integritate, constînd probabil în menţinerea dispoziţiei paralele a membranelor internă şi externă.

Multe dintre enzimele ciclului acizilor tricarboxilici trec uşor în soluţie apoasă dacă se fragmentează mitocondriile prin ultrasunete etc., ceea ce sugerează că aceste enzime se găsesc în stare dizolvată într-unul ori altul dintre compartimentele mitocondriilor sau, cel puţin, că ele nu sînt prea solid legate de structura acestora. În schimb, enzimele şi transportorii lanţului de transfer de electroni rămîn solid ancoraţi de micile vezicule şi de fragmentele mitocondriale formate în cursul acestei disruperi şi este probabil că *in vivo* ele sînt încorporate în structura membranelor mitocondriale. Transferul de-a lungul lanţului de transportori de electroni şi cuplarea acestui transfer cu fosforilarea ATP pare să fie realizată, într-un mod pe care nu-l cunoaştem încă, prin încorporarea enzimelor şi transportorilor acestui lanţ în membranele mitocondriale şi prin modul de dispunere a membranelor în cadrul mitocondriilor.

În fig. 6.15 etapele energetice succesive legate de deplasarea electronilor de-a lungul lanţului de transfer de electroni spre niveluri diferite de potenţial de oxidoreducere (redox) sînt comparate cu energia termodinamică potenţială necesară pentru producerea ATP din ADP. Deplasarea unei perechi de electroni în josul lanţului de transfer este capabilă să ducă la fosforilarea a două molecule de ADP în cazul lanţurilor care pleacă de la succinat, şi a trei molecule de ADP în cazul lanţurilor în care se intercalează NAD (nicotinamidă-adenin-dinucleotid) şi care pornesc de la ceilalţi compuşi intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici (fig. 2.5). O primă fosforilare pare să însoţească deplasarea electronului pe distanţa de la NAD la flavo-

Scanned with OKEN Scanner

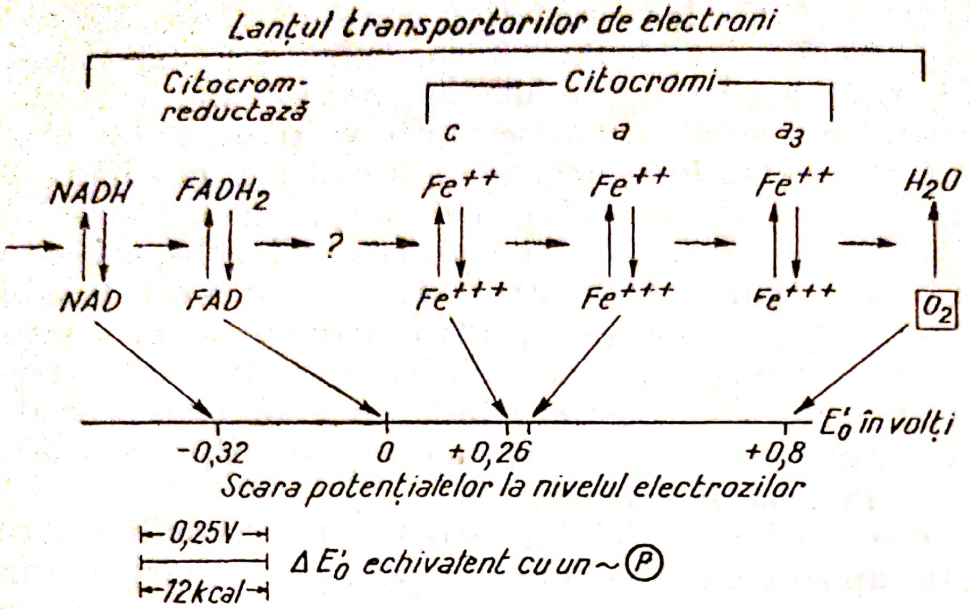


Fig. 6.15. Schemă a lanțului de transfer de electroni, care arată potențialele aproximative (E'_0) de oxidoreducere ale transportorilor de electroni (la pH ~ 7).

Modificarea energiei termodinamice potențiale care însoțește reacția ADP + P ⇄ AT(~Ⓟ = 12 kcal/mol) este generată de o pereche de electroni ce coboară o treaptă de potențial de oxidoreducere ($\Delta A'_0$) de 0,25 V (NAD = nicotinamidă-adenin-dinucleotid; FAD = flavin-adenin-dinucleotid) (după Lehninger, 1954).

proteină, a doua — deplasarea pe distanța de la flavoproteină la citocromul *c* și a treia — deplasarea de la citocromul *c* la oxigen. De la succinat, electronii trec direct la o flavoproteină în loc să treacă prin NAD. Electronii proveniți de la compușii intermediari ai catabolismului acizilor grași trec în unele cazuri prin NAD, în altele direct la flavoproteine.

Lipidele constituie 30—40% din greutatea uscată a mitocondriilor, printre ele găsindu-se fosfatidil-etanolamina, fosfatidilcolina și colesterolul (tabelul 6.2). Este de așteptat deci ca structura membranelor mitocondriale și activitatea enzimatică legată de ele să prezinte o oarecare asemănare cu structura și activitatea enzimatică a membranelor citoplasmatice. Una dintre caracteristicile activității acestor enzime legate de membrane ar putea consta în organizarea lor sub forma unor complexe multienzimatice, a căror funcție să depindă de integritatea structurală a complexului. În ceea ce privește modul de dispunere a transportorilor și enzimelor din lanțul de transfer de electroni, s-au propus următoarele alternative principale: ele ar putea

Scanned with OKEN Scanner

fi grupate sub forma unui complex ancorat de o singură parte a membranelor mitocondriale, deplasarea electronilor avînd loc în interiorul acestui complex; particulele de 8—9 mμ observabile în preparatele de mitocondrii prin tehnica constrastului negativ (fig. 5.11 *b*) ar putea reprezenta asemenea complexe. Cea de-a doua modalitate ar putea consta în încorporarea complexelor multienzimatice sau a enzimelor individuale în structura membranei, în aşa fel încît electronii sau atomii de hidrogen să fie transportaţi dintr-o parte a membranei în cealaltă. Fosforilarea ATP ar putea fi legată mai mult sau mai puţin direct de unele dintre reacţiile enzimatice care participă la transferul electronilor de la un transportor la cel următor, tot aşa cum este posibil ca ea să reprezinte un rezultat indirect al condiţiilor create de deplasarea electronilor sau atomilor de hidrogen de-a curmezişul membranelor.

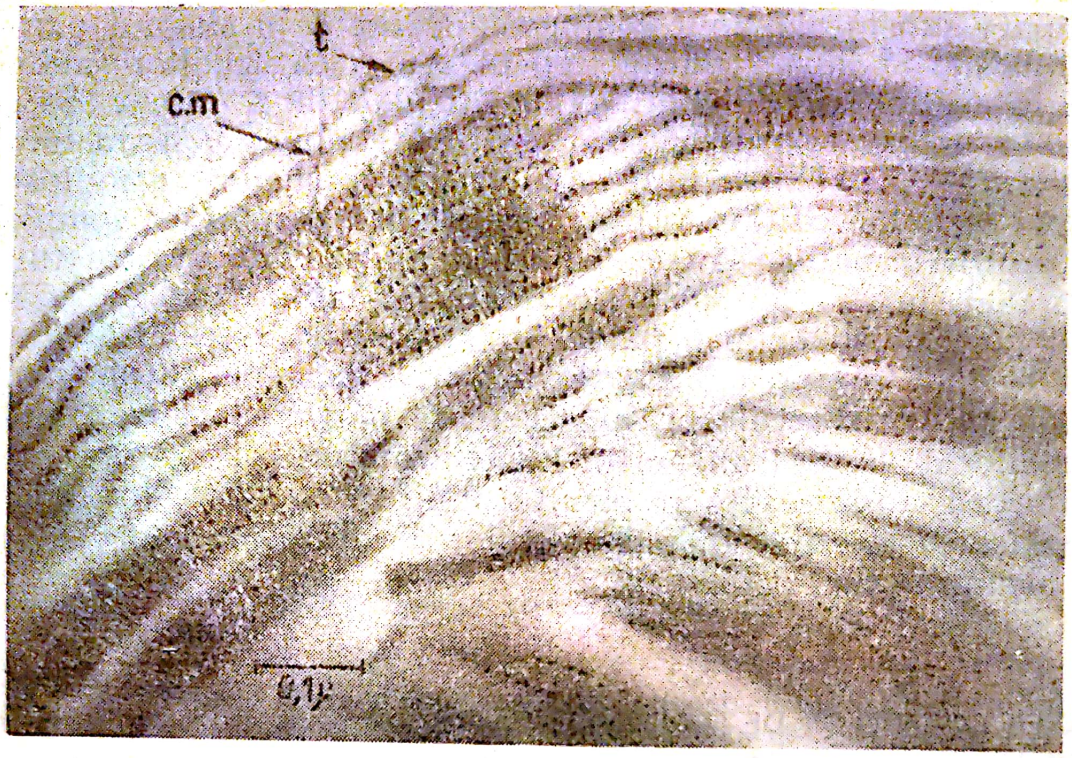
CAPTAREA CUANTELOR DE LUMINĂ DE CĂTRE BASTONAŞELE DIN RETINĂ ŞI CLOROPLAŞTI

Cuantele de lumină (adică mici „pachete" de energie luminoasă sînt captate de conurile şi bastonaşele retiniene într-o structură membranoasă stratificată, formată probabil prin ramificarea şi invaginarea membranei citoplasmatice (cap. 5, fig. 5.10). Stive similare de saci turtiţi sau de lamele se întîlnesc şi în cloroplaşti (fig. 6.16).

Pe microelectronografii de lamele din cloroplaşti, izolate şi parţial fragmentate, se observă că suprafaţa internă a membranelor lor este acoperită cu discuri ovalare avînd diametre de 18 mμ × × 15 mμ. Reacţiile de transport de electroni şi de fotosinteză care se desfăşoară în cloroplastul normal pot fi îndeplinite şi de fragmente de membrane lamelare dacă pe ele se mai găseşte încă fixat un număr de cca. 8 discuri. Un asemenea disc, împreună cu membrana de care este fixat, reprezintă probabil unitatea funcţională a cloroplastului (cuantozomul). Pe microelectronografii, discul apare ca fiind alcătuit din 4 sau mai multe subunităţi.

Un model al structurii moleculare posibile a membranelor cloroplaştilor a fost propus de către Calvin (fig. 6.17), care presupune că rolul stratului de lipide este în acest caz acela de a

Scanned with OKEN Scanner



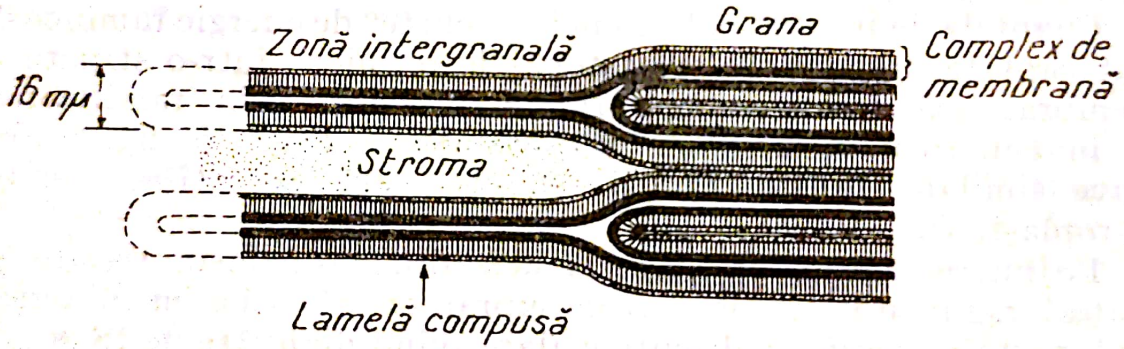


Fig. 6.16. Microelectronografie a unei celule de graminee în care se văd membranele interne și cele de înveliș ale cloroplastului, precum și membrana care limitează vacuola internă principală a celulei (tonoplastul).

Tonoplastul (*t*) este o membrană groasă de 7 mμ. Învelișul cloroplastului (*c.m.*) este constituit din două membrane complexe avînd aproximativ aceeași grosime și fiind separate printr-un spațiu de 10 mμ. Zonele din cloroplast în care membranele interne sînt stratificate formînd „stive" strînse și relativ regulate sînt denumite grane. Desenul din partea de jos arată modul în care sînt dispuse complexele de membrană în interior în regiunile granală și intergranală (modificat după Hodge, 1959).

separa radicalii reactivi formați inițial în urma absorbirii cuantei de lumină, spre a-i împiedica să se recombine între ei fără a presta un lucru chimic util. În schema lui Calvin, radicalii se

Scanned with OKEN Scanner

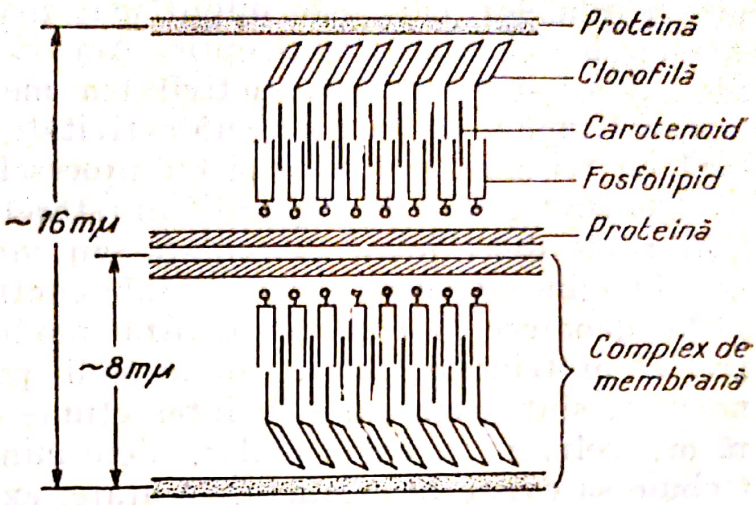


Fig. 6.17. Ipoteza lui Calvin asupra modului în care s-ar dispune componentele membranelor interne ale cloroplaştilor (după Hodge, 1959).

formează pe cele două feţe opuse ale membranei, ca rezultat al unui transport de electroni prin stratul lipidic, mediat probabil de carotenoizii ce conţin în molecula lor un lanţ hidrocarbonic lung caracterizat prin existenţa de duble legături conjugate pe toată lungimea sa (duble legături ce alternează cu legături simple). Asemănările structurale dintre cloroplaşti şi conurile şi bastonaşele retiniene sugerează că ar putea exista asemănări şi între procesul iniţial de absorbire a cuantelor de lumină în aceste două cazuri, cu toate că în cloroplaşti acest proces iniţiază ciclul complex de reacţii al fotosintezei, în timp ce în conurile şi bastonaşele retinei absorbţia cuantelor duce la generarea unui potenţial de acţiune în membrana celulei nervoase adiacente. Nu se ştie încă nimic despre amănuntele acestui din urmă proces, totuşi, dacă este adevărat că între cutele structurii membranoase a conurilor şi bastonaşelor şi membrana citoplasmatică din care s-au format aceste cute se păstrează o continuitate, s-ar putea concepe ca o depolarizare locală a membranelor interne stratificate, generată în punctul de absorbţie cuantică, să iniţieze un potenţial de acţiune. Acesta ar progresa prin întregul sistem de membrane al celulei cu conuri sau cu bastonaşe către joncţiunea sinaptică cu celula nervoasă învecinată.

Cu aceasta nu încheiem numai un capitol, ci am ajuns, dintr-un anumit punct de vedere, la sfîrşitul primei părţi a acestui volum. Cercetările experimentale descrise pînă aici, în capitolul prezent şi în cele anterioare, ne-au permis construirea unei ima-

gini a celulelor, care este infinit mai detaliată decît aceea evidenţiabilă cu microscopul optic. Am văzut că proteinele, acţionînd ca enzime, dirijează activitatea metabolică a celulei; am analizat modul în care această activitate poate fi pusă în legătură cu mişcarea celulelor şi cu procesele de transport atunci cînd enzimele sînt încorporate în structuri mai mari, cum ar fi fibrilele din celulele musculare sau membranele lipoproteice.

Imaginea noastră despre celule continuă să fie însă incompletă, deoarece încă nu am analizat modul de sintetizare şi control al proteinelor înseşi. Cromozomii, pe care pînă acum i-am neglijat, sînt aceia care, în interacţiune cu mediul lor înconjurător, celular şi extracelular, determină ce anume proteine trebuie să existe în celulă şi, ca atare, exercită controlul primar asupra activităţii celulei. În a doua jumătate a acestei cărţi vom examina comportarea cromozomilor, natura lor chimică şi rolul pe care îl au în sinteza proteinelor.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 7

COMPORTAREA CROMOZOMILOR ÎN CURSUL MEIOZEI

TEORIA PLASMEI GERMINATIVE

Biologii secolului al XIX-lea — şi în special August Weissman — au reuşit să sesizeze existenţa unei deosebiri între „ceva" foarte stabil, care trece virtual nemodificat de la o generaţie la alta, şi desfăşurarea fenomenelor din organismul perisabil al unui individ căruia acest „ceva" i-a dat naştere. Pentru aceste două categorii, Weissman a propus termenii de „plasmă germinativă" şi, respectiv, „somă" (cuvînt grecesc care înseamnă corp). Se ştie astăzi că rolul de pivot dintre acestea două este jucat de cromozomi. Cromozomii celulelor sexuale (gameţi) — care poartă informaţia genetică necesară formării unui individ nou — ar putea fi consideraţi drept „plasma germinativă" a lui Weissman. Sarcina de a transmite această informaţie mecanismului metabolic al tuturor celorlalte celule ale corpului este preluată de către descendenţii direcţi ai cromozomilor din celula sexuală, cromozomii celulelor somatice.

În fig. 7.1, schema clasică a lui Weissman a fost transpusă într-o formă modernă. Se poate vedea cum cromozomii de la nivelul liniei germinale, autoreplicîndu-se, asigură atît transmiterea către celulele somatice a propriilor lor copii, cît şi înzestrarea celulelor sexuale cu mesajul necesar descendenţilor. În această schemă, caracteristicile organismului *(fenotipul)* sînt determinate concomitent pe de o parte de condiţiile mediului înconjurător, iar pe de altă parte de complementul cromozomial moştenit *(genotip)*. Schema exclude posibilitatea ca mediul înconjurător să influenţeze eventual genotipul prin intermediul modificărilor somatice. Această limitare poate fi criticată ca

fiind ultradogmatică. Într-adevăr, dacă eforturile actuale de descifrare a structurii chimice a cromozomilor vor fi încununate de succes, nu ar fi exclus ca în viitor să devină posibil ca, prin folosirea dirijată a agenților din mediul extern, să se obțină modificări specifice ale codului genetic.

Cu toate acestea, pentru scopurile pe care le urmărește expunerea noastră, formularea lui Weissman poate fi acceptată, deoarece aproximează într-un mod corespunzător faptele care se întîlnesc în majoritatea cazurilor. În același timp, este important să se sublinieze că în desenul nostru am inclus și o săgeată care reprezintă rolul influențelor din mediul înconjurător în modelarea fenotipului; acest lucru este deseori omis în schemele din diferitele manuale. Cînd caracterul fenotipic pe care îl studiem este expresia destul de nemijlocită a genotipului, așa cum ar fi un caracter de grup sanguin, omisiunea nu este gravă dat fiind

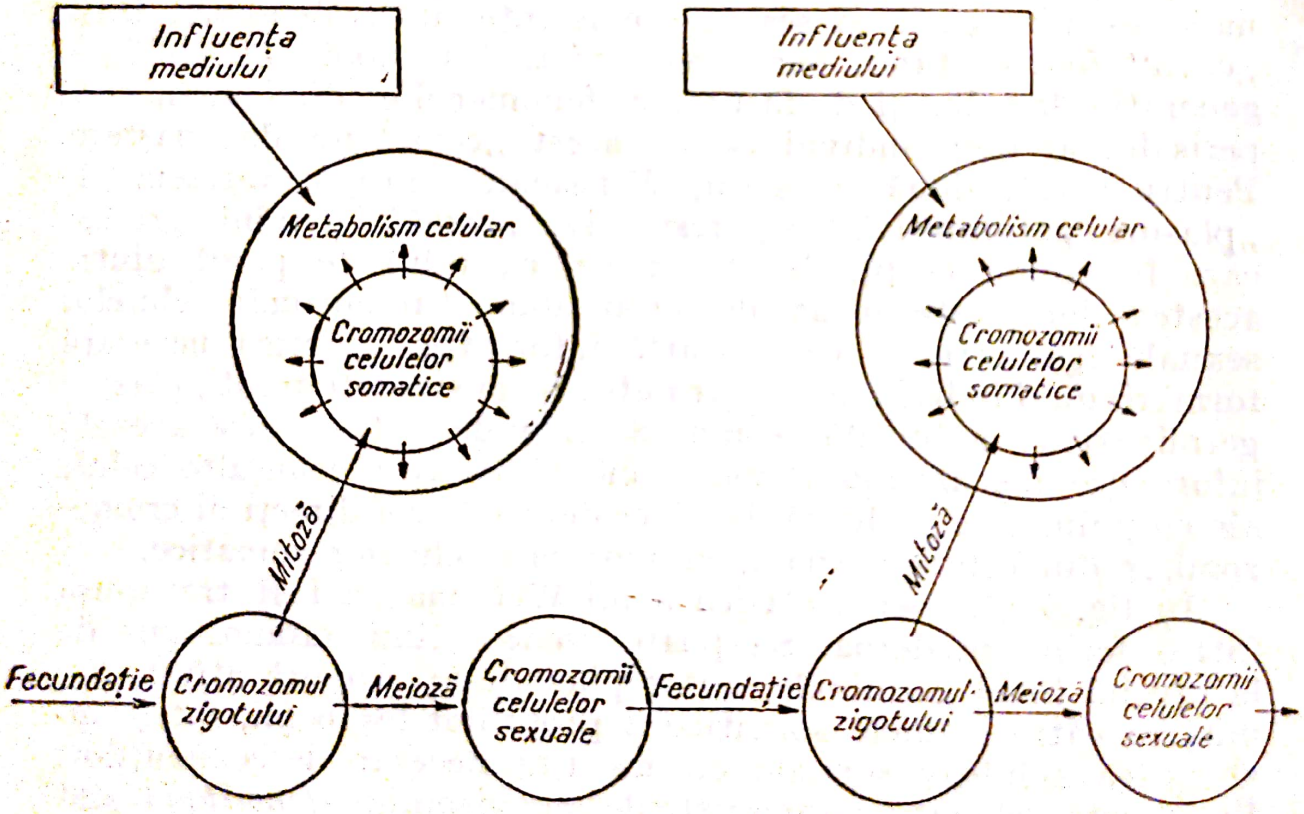


Fig. 7.1. Transmiterea informației genetice, prezentată în termenii concepției lui Weissman a „plasmei germinative".

Șirul de săgeți orizontale corespunde „continuității germinative", redată ca fiind independentă și neinfluențată de procesele metabolice ce au loc în „soma" pieritoare (organismul), care ia naștere din ea în fiecare generație. Zigotul este celula unică formată prin unirea celulelor sexuale masculă și femelă.

Scanned with OKEN Scanner

faptul că măsura în care caracterul ar putea fi modificat de mediu în cursul dezvoltării individului este foarte restrînsă. Dar marea majoritate a caracterelor care se pot observa la fiinţele vii, cum ar fi talia, forma, fertilitatea, longevitatea, inteligenţa, trăsăturile comportamentului etc., sînt puternic influenţate de hrană. Ca urmare, forma finală pe care o îmbracă un caracter este de obicei mai puţin influenţată de zestrea ereditară decît de acţiunea cumulativă a unor factori extrinseci.

MITOZA

Un ou fecundat (zigotul) este o celulă unică formată din unirea unui ovul (gamet femel) cu un spermatozoid (gamet mascul). Prin diviziuni succesive, el dă naştere la multe milioane de celule somatice. Fiecare dintre acestea, cu unele excepţii cu totul speciale, este echipată cu o garnitură completă de cromozomi, jumătate proveniţi de la mamă şi jumătate de la tată. Acest tip de diviziune celulară mitotică permite ca fiecare celulă-fiică să primească o copie exactă a aparatului cromozomial al zigotului original, fără să i se adauge sau să i se scadă ceva (cap.1). Din ansamblul acestui proces, ce constituie o reorganizare cu adevărat dramatică a întregii celule, vom desprinde acum fenomenele cromozomiale pure şi le vom supune unei analize mai amănunţite. În acest mod vom pregăti cel mai bine terenul pentru înţelegerea ,,meiozei", acea formă specială de diviziune celulară prin care o garnitură de material genetic primit de la părinţi este împărţită între gameţi pentru a fi trecută apoi generaţiilor următoare.

În faza timpurie a profazei mitotice cînd cromozomii încep să devină clar vizibili, ei sînt dispuşi în interiorul nucleului într-un mod mai mult sau mai puţin neregulat (cap. 1). Neregularitatea nu este însă totală, deoarece se poate observa că cromozomii nu se ating între ei. Din primul moment al mitozei cromozomii apar dubli, fiecare prezentîndu-se sub forma a două cromatide paralele şi dispuse foarte apropiat, cu excepţia centromerului care, în acest stadiu, rămîne nedivizat. Astfel, deşi diviziunea celulară urmează abia să se producă, duplicarea materialului cromozomial a şi avut loc. Restul mitozei are doar rolul de a asigura o deplasare a celor două cromatide ce alcătuiau fiecare

Scanned with OKEN Scanner

cromozom către polii opuşi ai celulei în diviziune. Acest lucru se realizează în cursul metafazei, prin diviziunea centromerelor. În cursul anafazei, membrii fiecărei perechi de centromere-fiice se deplasează către polii opuşi ai celulei, trăgînd după sine şi astfel separînd cele două cromatide care, acum, pot fi denumite cromozomi. Sfîrşitul telofazei constă în clivarea finală a citoplasmei, ajungîndu-se în acest fel la două celule complete şi de sine stătătoare, identice în ceea ce priveşte numărul de cromozomi una cu cealaltă, precum şi cu celula parentală unică din care s-au format. Cînd cele două celule-fiice trec în interfază, cromozomii dispar, în sensul că metodele convenţionale de citologie se dovedesc din nou neadecvate pentru a pune în evidenţă prezenţa lor.

MEIOZA

Vom examina acum forma specială de diviziune celulară prin care iau naştere gameţii. La prima vedere nu pare necesară existenţa, în acest caz, a unui mecanism deosebit. De ce gameţii nu pot descinde şi ei din precursorii lor celulari prin diviziune mitotică? Un răspuns convingător este oferit de un simplu calcul aritmetic. Numărul de cromozomi din orice descendent mitotic al unui zigot poate fi desemnat prin simbolul $2n$, în care n cromozomi au fost iniţial primiţi de la mamă şi n de la tată. Dacă gameţii s-ar forma prin mitoză, un ovul ar conţine $2n$ cromozomi şi ar fi fecundat de un spermatozoid care conţine tot $2n$ cromozomi. Celulele care ar descinde prin mitoză dintr-un asemenea zigot ar avea, prin urmare, fiecare cîte $4n$ cromozomi, iar în generaţia imediat următoare şi în cele ulterioare, numărul ar deveni $8n$, $16n$, $32n$ etc.

Pentru evitarea acestei absurdităţi, trebuie ca la un moment dat să se interpună o *diviziune reductivă*, prin care numărul de cromozomi este redus la jumătate. O asemenea înjumătăţire are loc într-adevăr în cursul formării gameţilor, aşa încît spermatozoidul sau ovulul conţine un număr *haploid* (de la cuvîntul grecesc *haplo* = singur) n de cromozomi în loc de numărul $2n$, *diploid* (de la cuvîntul grecesc *diplo* = dublu). Modalitatea prin care se realizează acest fenomen poartă denumirea de diviziune meiotică şi ea este regăsită într-o formă esenţialmente

Scanned with OKEN Scanner

identică în cuprinsul întregului regn animal, vegetal, precum și în lumea fungică. Meioza se caracterizează prin aceea că se produc două diviziuni ale nucleului, în timp ce cromozomii suferă o singură diviziune. Amănuntele acestui proces sînt importante și vor fi descrise în cele ce urmează.

PRIMA DIVIZIUNE MEIOTICĂ

Profaza primei diviziuni meiotice durează mai mult și este mai bogată în modificări decît cea caracteristică mitozei. Ea poate fi împărțită în leptoten, zigoten, pahiten și diploten. Acești termeni sînt doar etichete utile pentru a desemna stadiile diferite ale unui proces care, în realitate, se desfășoară neîntrerupt, iar încercarea de a-i memoriza aduce foloase reduse în comparație cu observarea directă a procesului însuși. De aceea, în titlurile celor trei paragrafe ce urmează vom adăuga la denumirile convenționale cîte o propoziție aleasă astfel încît să atragă atenția asupra uneia dintre caracteristicile stadiului respectiv.

STADIUL LEPTOTEN.
CROMOZOMII SÎNT GATA DIVIZAȚI

Prin tradiție, s-a susținut că aspectul profazei în cazul meiozei diferă de stadiul timpuriu al profazei din mitoză printr-un element foarte important. S-a afirmat că în leptoten cromozomii nu sînt încă împărțiți în două cromatide, dat fiind că la microscop nu se observă o dublă structură a cromozomului, de tipul celei ce apare în profaza mitozei. Astăzi se știe însă aproape cert că acest punct de vedere este incorect.

Dacă în leptoten cromozomii ar fi încă nedivizați, atunci provocarea în acest stadiu a unor rupturi cromozomiale prin iradiere cu raze X ar trebui să se traducă mai tîrziu prin leziuni ale ambelor cromatide-fiice. Dacă, dimpotrivă, clivajul este gata produs, leziunea va fi prezentă numai într-una din cromatidele unei perechi. Or, S. Mitra, lucrînd cu *Lilium longiflorum*, a pus în evidență acest din urmă tip de distribuție a leziunilor și, aplicînd iradierea în stadii diferite ale ciclului de diviziune, acest autor a putut să determine cu precizie momentul în care

Scanned with OKEN Scanner

are loc duplicarea cromozomului. A reieşit că aceasta se produce înainte de apariţia profazei meiotice, astfel încît în leptoten cromozomii trebuie să fie alcătuiţi fiecare din două cromatide apropiate atît de mult, încît dau impresia unei singure structuri. Ca atare, diferenţa dintre leptoten şi situaţia care se întîlneşte la începutul profazei mitotice este mai degrabă aparentă decît reală.

Cu toate acestea, există, dintr-un anumit punct de vedere, o reală deosebire, ce are o oarecare importanţă pentru înţelegerea mecanismului *crossing-over*-ului, care va fi discutat mai tîrziu. În faza timpurie a mitozei, aşezarea aparent întîmplătoare a cromozomilor în nucleul celulei este supusă unei restricţii, în sensul că între ei nu există un contact reciproc. În stadiul echivalent al meiozei asemenea restricţii nu se mai întîlnesc.

STADIUL ZIGOTEN. ÎMPERECHEREA CROMOZOMILOR OMOLOGI

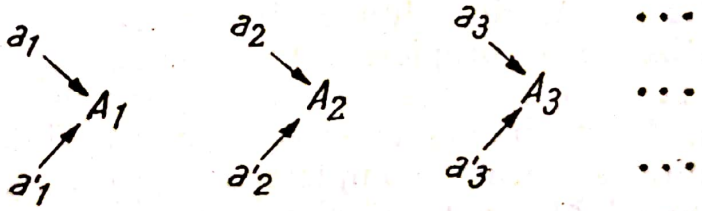
În cursul diviziunii mitotice nu există, cu rare excepţii, o interacţiune între cromozomii omologi, adică între un cromozom dat dintre cei *n* proveniţi de la mamă şi cromozomul corespunzător dintre cei moşteniţi de la tată. Dimpotrivă, în faza de leptoten a meiozei se vede cum cromozomii unei perechi omologe vin în contact reciproc intim prin unul sau mai multe puncte situate de-a lungul lor. În cursul fazelor mai tîrzii ale ciclului de diviziune meiotică, zonele de contact se propagă de-a lungul întregii lungimi a cromozomului, de la punctul iniţial de contact spre ambele capete, într-un mod asemănător celui în care se încheie un fermoar.

Pentru a avea o idee mai exactă a ceea ce se înţelege prin cromozomi „omologi", să ne oprim asupra unui cromozom oarecare, ales la întîmplare, şi care, să presupunem, ar proveni de la tată. El va fi uşor de individualizat, deoarece prezintă de-a lungul său neregularităţi uşor evidenţiabile sub forma unor umflături şi strangulări neregulate care-i dau un aspect caracteristic. Dacă vom nota în mod arbitrar aceste puncte de reper cu o serie de simboluri, ca: *a*, *b*, *c*, *d*, *e*... etc., vom putea întotdeauna să indentificăm undeva în interiorul aceluiaşi nucleu diploid un alt cromozom care seamănă exact cu primul în ceea ce

Scanned with OKEN Scanner

privește lungimea, poziția centromerelor și dispoziția liniară a altor repere (pe care, de data aceasta, le putem nota cu a', b', c', d', e'... etc.). Dacă primul cromozom considerat a fost de proveniență paternă, al doilea își are originea de la mamă. Doi cromozomi care se află în asemenea relații sînt denumiți omologi. Orice garnitură diploidă de $2n$ cromozomi este deci alcătuită din n perechi omologe. De asemenea, este evident că se poate vorbi de regiuni omologe, adică a este omolog cu a', b cu b' etc. (Cromozomii răspunzători de determinarea sexului constituie o excepție: spre exemplu, la mamifere, cromozomii de sex ai femelei, cu formula XX, sînt total omologi în sensul celor spuse mai sus, în timp ce la mascul — cu formula XY — acest lucru nu se întîmplă).

În cap. 10 se va lămuri faptul că baza genetică a omologiei rezidă în aceea că grupul de gene situate în regiunea a influențează aceeași serie de caractere ca și grupul de gene moștenite de la celălalt părinte și care sînt situate în a'. Această interrelație se păstrează și la niveluri inferioare de subdiviziune, astfel încît dacă subîmpărțim regiunea a într-o secvență de gene moștenite de la tată a_1, a_2, a_3, . . . etc., atunci regiunea a' va fi constituită dintr-o secvență liniară de gene materne corespunzătoare a'_1, a'_2, a'_3, . . . etc. În consecință caracterele respective ale organismului — A_1, A_2, A_3 . . . etc. — sînt guvernate de acțiunea combinată a perechilor analoge de gene paterne și materne, ceea ce s-ar putea figura astfel:



Pentru a contura mai precis această idee, ar trebui să definim „caracterul" în termeni biochimici; aceasta ne-ar obliga însă să anticipăm prea mult asupra subiectului ce va fi tratat în cap. 10.

Împerecherea cromozomilor omologi a fost asemuită mai sus cu modul în care se încheie un fermoar, ea progresînd în fiecare direcție plecînd de la unul sau mai multe puncte inițiale de contact. Această metaforă este deosebit de potrivită dacă se înțelege că împerecherea constă din unirea exactă, unul cîte unul, a

punctelor corespunzătoare, aşa cum apare reprezentat schematic în fig. 7.2. Zonele *C* şi *C'* reprezintă centromerele respective. În conformitate cu cele ce s-au spus în legătură cu momentul

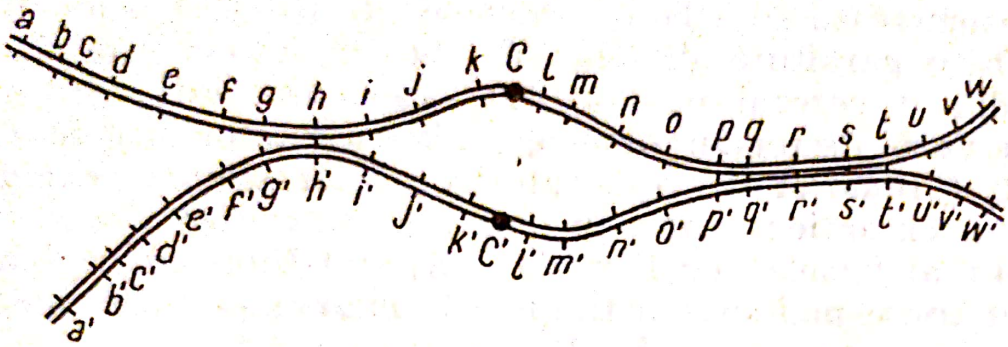


Fig. 7.2. Reprezentare schematică a începutului împerecherii dintre doi cromozomi omologi, în cursul primei diviziuni meiotice. Pentru explicaţii, vezi text. *C* şi *C'* simbolizează centromerele.

în care are loc clivarea cromozomilor în cromatide, fiecare lanţ a fost figurat printr-o linie dublă, cu excepţia centromerelor, care rămîn nedivizate.

STADIILE PAHITEN ŞI DIPLOTEN. ÎMPERECHEREA SE DESĂVÎRŞEŞTE ŞI APAR CHIASMELE

În cele din urmă, de-a lungul întregii lungimi a cromozomului, se realizează o apropiere extrem de intimă a elementelor omologe şi se produce o oarecare scurtare şi îngroşare a lanţurilor împerecheate. Acest moment marchează stadiul pahiten al profazei meiotice. Fiecare complex de perechi este *bivalent*, avînd o origine dublă, paternă şi maternă.

Modificarea următoare, care marchează începutul stadiului de diploten, constă în separarea fiecărui element bivalent în cele două jumătăţi care îl alcătuiesc prin depărtarea celor două centromere. Acestea sînt centromerele celor doi cromozomi omologi ; centromerele înseşi nu se divid în cursul primei diviziuni meiotice a celulei. Pe măsură ce diverg, fiecare centromer trage după sine perechea de cromatide de care este legat şi care de-abia acum devine vizibilă la microscop, ca avînd o structură dublă. Separarea completă a materialului cromozomial de origine

Scanned with OKEN Scanner

paternă și maternă este însă restrînsă prin apariția a ceea ce numim *chiasme* (cuvînt de origine greacă, utilizat pentru a descrie *crossing-over*-ul, sugerat de forma literei χ din alfabetul grec). Aspectul chiasmelor este redat în microfotografia din fig. 7.3,

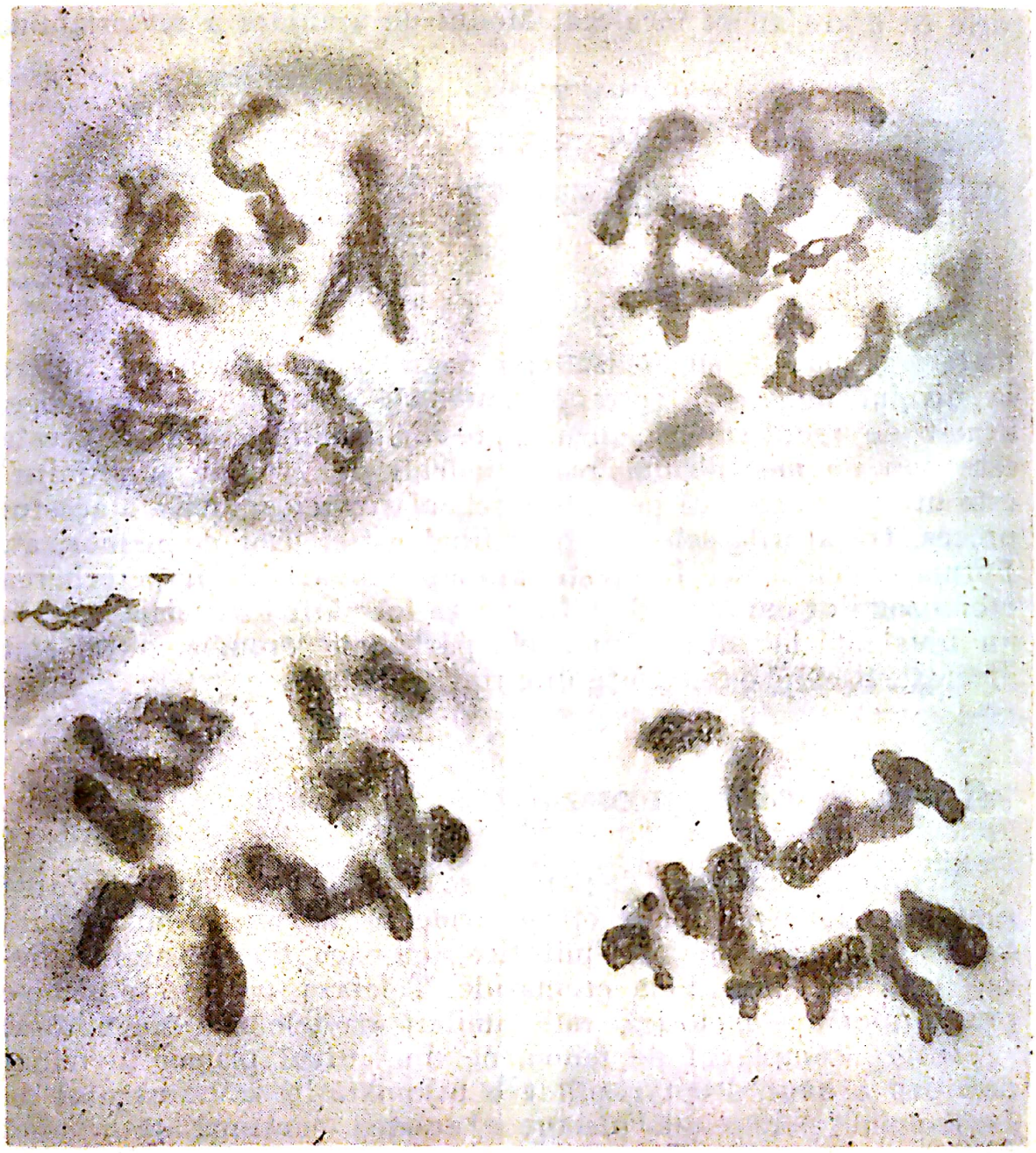
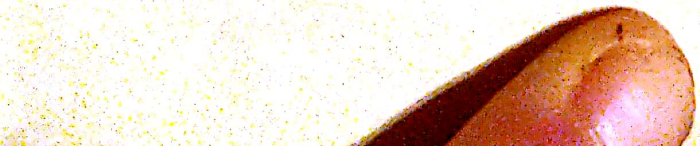


Fig. 7.3. Fotografii ale împerecherii cromozomilor la crin în cursul meiozei, în care se pot vedea chiasmele (mărire 1 500 x) (după Darlington, 1953).



Scanned with OKEN Scanner

iar modalitatea prin care are loc schimbul de material genetic este explicată schematic în fig. 7.4.

Pentru schimbul genetic ce se realizează prin formarea chiasmei s-a adoptat termenul de *crossing-over*, dar, privind schema din fig. 7.4, devine evident faptul că în realitate cromatidele ca atare nu se încalecă. Modul de aranjare a materialului

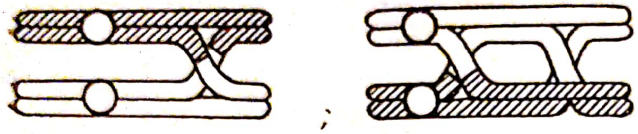


Fig. 7.4. Reprezentare pur schematică a procesului de *crossing-over*.

În dreapta este reprezentat un model cu două punți care exemplifică un *crossing-over* triplu catenar, în care sînt deci concomitent implicate trei dintre cele patru cromatide. Materialul cromatidic de origine paternă este haşurat, cel de origine maternă — nehaşurat. Centromerele nu au fost haşurate.

matern şi patern sugerează mai degrabă un proces de rupere la nivelul punctelor corespondente ale cromatidelor omologe, urmat de reunirea cu lanţul „greşit". Indiferent dacă acesta este sau nu mecanismul real, modelul de „rupere şi reunire" este util prin aceea că permite o schematizare sugestivă a acestui proces, trăsăturile sale esenţiale fiind astfel uşor de memorizat. Formarea chiasmei însoţeşte aproape invariabil împerecherea cromozomilor omologi, deşi frecvenţa formării lor variază de la un bivalent la altul. Diferitele părţi ale cromozomului sînt afectate şi ele cu frecvenţe diferite.

METAFAZA, ANAFAZA ŞI TELOFAZA

Membrana nucleară dispare şi se conturează fusul. Migrarea centromerelor spre polii opuşi urmează o cale asemănătoare cu cea din cursul anafazei mitotice, cu excepţia faptului că fiecare poartă cu sine două cromatide. Telofaza, cu care se încheie prima diviziune meiotică este similară cu telofaza din mitoză.

Întreg complexul de fenomene din cursul primei diviziuni meiotice a avut drept rezultat o înjumătăţire a numărului de centromere per celulă (deoarece acestea continuă să rămînă nedivizate), în timp ce numărul cromatidelor după diviziune este egal cu numărul diploid de cromozomi din celulele somatice (fig. 7.5). Compoziţia cromatidelor însă este foarte diferită

Scanned with OKEN Scanner

după prima diviziune meiotică. În regiunea fiecărui centromer, ambele cromatide atașate nu sînt alcătuite exclusiv dintr-un material de aceeași origine, maternă sau paternă, ca și centromerul însuși. Dar, ca o consecință a schimbului ce are loc cu ocazia formării chiasmelor, restul fiecărei cromatide a devenit un mozaic

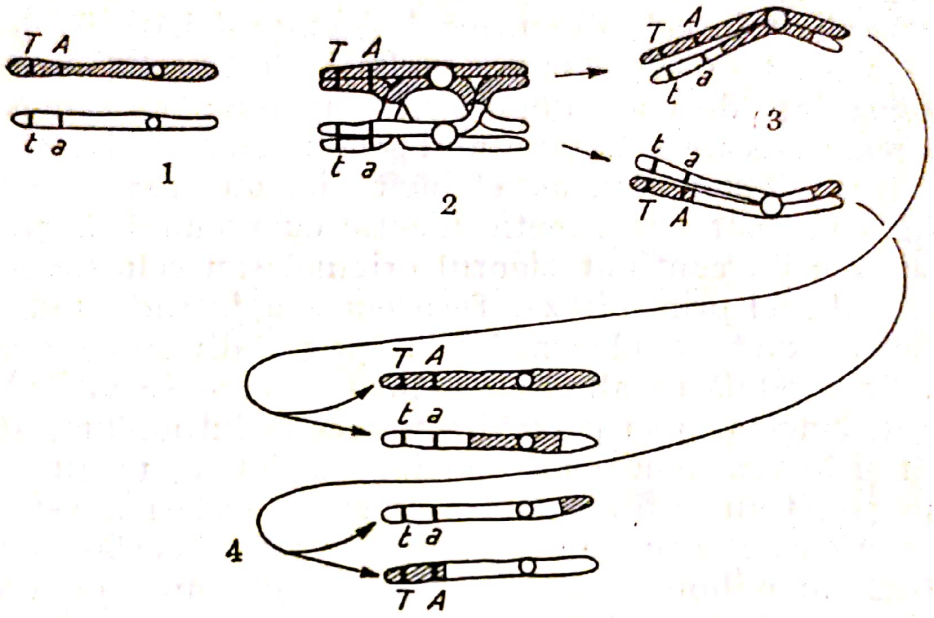


Fig. 7.5. Redistribuirea materialului provenit dintr-o pereche de cromozomi în cursul primei și celei de-a doua diviziuni meiotice.

În prima diviziune meiotică, partenerii perechi de cromozomi omologi (1) se divid cu *crossing-over* (2) și se separă, îndreptîndu-se spre polii opuși (3). În cea de-a doua diviziune meiotică, diviziunea centromerelor dă naștere la patru cromozomi diferiți din punct de vedere genetic (4), din care fiecare va forma o parte din garnitura cromozomială haploidă a gametului.

de material matern și patern. Cromozomii celulei somatice pot fi, dimpotrivă, grupați în perechi omologe, constituite fiecare din cîte un cromozom întreg ce descinde exclusiv de la mamă și unul care provine exclusiv de la tată.

A DOUA DIVIZIUNE MEIOTICĂ

În cursul celei de-a doua diviziuni meiotice, care urmează unei interfaze extrem de scurte, procesele ce au loc sînt asemănătoare cu cele din cursul mitozei. Deosebirea rezidă în faptul că în această a doua diviziune meiotică împărțirea fiecărui cromozom în cromatide a preexistat în tot ciclul celular ante-

Scanned with OKEN Scanner

rior și se moștenește direct de la acesta, pe cînd în cazul mitozei ea s-a produs în cursul interfazei imediat premergătoare și deci relativ recent. În cea de-a doua diviziune meiotică, toți centromerii se despart în două, întocmai ca în mitoză, iar jumătățile ce rezultă migrează spre polii opuși, fiecare ducînd cu sine cîte o cromatidă, care acum poate fi denumită cromozom. Astfel se ajunge în cele din urmă la numărul haploid de cromozomi.

Un alt proces care s-a realizat cu această ocazie și care are consecințe de mare importanță din punct de vedere genetic este o reamestecare a materialului genetic matern și patern, ca urmare a *crossing-over*-ului, astfel încît nici un cromozom din gametul final nu mai este genetic identic cu vreunul dintre cromozomii pe care i-a conținut zigotul original sau celulele somatice derivate din el prin mitoze. De asemenea, întrucît numărul și localizarea exactă a chiasmelor în prima diviziune meiotică diferă de la o celulă la alta, iar polul spre care se va îndrepta fiecare centromer al unei perechi este ales la întîmplare, atît în prima cît și în cea de-a doua diviziune meiotică, rezultă că niciodată un gamet nu va fi constituit din exact același amestec de material genetic ca al altui gamet produs de unul și același individ. Astfel, dacă un milion de ovule identice din punct de vedere genetic ar putea fi fecundate fiecare cu cîte un spermatozoid provenit dintr-o singură ejaculare, am obține un milion de *descendenți deosebiți între ei din punct de vedere genetic*. În ciuda faptului că toți descendenții au primit jumătate din zestrea lor ereditară de la același tată, s-ar constata că patrimoniul fiecărui individ este rezultatul unei combinații diferite a genelor celor doi părinți ai tatălui. Acest fapt este de un deosebit interes, deoarece el reprezintă baza materială a „segregării" și „recombinării" caracterelor moștenite, bază pe care s-au clădit de un secol încoace cercetările de genetică. Acest aspect va fi discutat în amănunt în cap. 10.

CROSSING-OVER-UL, O PROBLEMĂ NEREZOLVATĂ

În cele prezentate pînă acum, două aspecte importante au fost tratate mai superficial, iar una sau două probleme au fost omise în mod deliberat pentru a fi tratate mai tîrziu. Acestea ar putea fi formulate astfel:

Scanned with OKEN Scanner

1) În care dintre stadiile primei diviziuni meiotice are loc *crossing-over*-ul?

2) Cum se explică faptul că fiecare cromozom își găsește partenerul omolog în vederea împerecherii?

Concepția clasică nu dă un răspuns la cea de-a doua problemă, iar pentru prima dispune de un răspuns bazat pe bunul simț. Pornind de la faptul că scindarea cromozomilor în cromatide nu putea fi pusă în evidență înainte de stadiul pahiten (stadiul de împerechere intimă și completă), se putea trage numai concluzia că fenomenul de *crossing-over* dintre cromatide are loc în cursul acestui stadiu. În stadiul următor, diploten, este cert că acest proces trebuie să se fi încheiat, dată fiind prezența chiasmelor. Această ipoteză părea și din alte puncte de vedere acceptabilă, deoarece se putea presupune că ocaziile de producere a unui schimb reciproc de material sînt cu atît mai numeroase, cu cît împerecherea dintre elementele omologe este mai intimă și mai prelungită. Știm acum că încă înainte de apariția profazei meiotice cromozomii sînt deja dedublați, astfel încît problema stabilirii momentului cînd se produce *crossing-over*-ul este din nou deschisă. Există oare unele avantaje care să derive din presupunerea că fenomenul are loc într-un stadiu timpuriu al acestui ciclu de transformări? R. H. Pritchard dă un răspuns afirmativ la această întrebare, emițînd o teorie pe care o expunem în cele ce urmează.

Se presupune că în cursul interfazei premeiotice cromozomii se mișcă în toate direcțiile în mod dezordonat în interiorul nucleului, dar că tind să adere între ei ori de cîte ori regiuni omologe ale cromozomilor omologi ajung din întîmplare să vină în contact. Se crede deci că fenomenul de *crossing-over* s-ar produce la nivelul acestor zone de contact în cursul duplicării cromozomilor în cromatide. Am arătat mai sus că ulterior, în stadiul inițial al profazei, cînd cromozomii devin vizibili, punțile de contact dintre ei sînt deja existente, spre deosebire de faza analogă a mitozei cînd, asemenea conexiuni nu se găsesc. Conform teoriei lui Pritchard, *crossing-over-ul a și avut loc* în aceste regiuni de contact omolog timpuriu, care astfel reprezintă puncte de ancorare de la care se va propaga alipirea strînsă intercromozomială ulterioară. În acest mod s-ar rezolva în bună parte problema „găsirii partenerului", *crossing-over*-ul

Scanned with OKEN Scanner

fiind astfel conceput ca o cauză, şi nu ca un efect al împerecherii omologe care se observă în stadiul pahiten.

Teoria lui Pritchard este sprijinită de o serie de date privitoare la consecinţele genetice ale *crossing-over*-ului. Aşa cum va reieşi din cap. 10, analiza genetică fină efectuată pe microorganisme cu frecvenţă mare de conjugare permite să se cartografieze distribuţia modificărilor de *crossing-over* de-a lungul unor fragmente de cromozom extrem de scurte. Rezultatele acestui fel de cercetări evidenţiază în mod clar existenţa unui fenomen denumit „interferenţă negativă"; acesta constă în faptul că un *crossing-over* este mult mai frecvent însoţit de altele în regiunea imediat vecină decît ne-am aştepta să se producă prin simplă întîmplare. Conform teoriei lui Pritchard, acest fenomen corespunde întru totul aşteptărilor dacă se porneşte de la presupunerea că punţile care se formează între cromozomii omologi sînt destul de întinse pentru a permite apariţia mai multor fenomene de *crossing-over* în cadrul fiecărei asemenea porţiuni. Aceste regiuni ar fi separate prin zone relativ lungi în care nu au loc astfel de fenomene.

Problemele discutate mai sus nu sînt încă definitiv rezolvate. Vom înţelege întreaga lor importanţă cînd vom analiza structura chimică detaliată a cromozomilor şi mecanismul replicării acestei structuri.

Scanned with OKEN Scanner

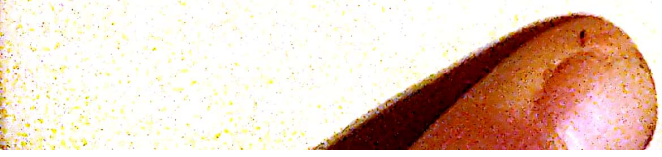
Capitolul 8

NATURA CHIMICĂ A MATERIALULUI EREDITAR

Cu ajutorul determinărilor de histochimie şi al altor analize citologice, s-a stabilit că cromozomii sînt formaţi din dezoxiribonucleoproteine, adică din complexe alcătuite din proteine şi acid dezoxiribonucleic (ADN.) Mult timp nu s-a ştiut cu precizie dacă informaţia genetică îşi are sediul în componenta proteică sau, dimpotrivă, în ADN. În acest capitol vom trece în revistă izvoarele de date a căror confluenţă a determinat pe biologi ca în atribuirea rolului genetic să încline în favoarea ADN şi nu a proteinei. Vom vedea că nici una dintre experienţe, luată izolat, nu este concludentă prin ea însăşi. Înmănuncherea diferitelor rezultate experimentale, precum şi o serie de consideraţii teoretice au fost însă suficiente pentru a convinge majoritatea cercetătorilor din acest domeniu că informaţia genetică se găseşte codificată în detaliile structurii moleculare a ADN.

CONSTANŢA CONŢINUTULUI ÎN ADN AL NUCLEELOR CELULARE

Cantitatea de ADN din nucleul tuturor celulelor unui ţesut diploid este constantă. Celulele spermatice, care sînt haploide, conţin exact jumătate din această cantitate de ADN. Aceste constatări concordă foarte bine cu ideea că genele sînt constituite din ADN. Pe de altă parte însă, în nucleele celulelor somatice poate fi pusă de obicei în evidenţă o constanţă similară a fracţiunii proteice a histonelor. Argumentul furnizat de constanţa cantităţii de ADN nu este deci concludent. Într-adevăr, ne-am



Scanned with OKEN Scanner

putea aştepta la aceeaşi constanţă a ADN, chiar dacă acesta ar reprezenta un simplu schelet inert cu rol de susţinere a materialului genetic.

NATURA MUTAGENILOR FIZICI ŞI CHIMICI

Agenţii care provoacă mutaţii (modificări ereditare) sînt în general cei care au tendinţa să acţioneze specific, sau în primul rînd, asupra acizilor nucleici. Un astfel de agent mutagen este lumina ultravioletă, iar eficienţa de producere a mutaţiilor pe care o prezintă radiaţiile ultraviolete de diferite lungimi de undă este în strînsă corelaţie cu spectrul de absorbţie al acizilor nucleici. De asemenea, 5-bromo-uracilul, o bază azotată, este suficient de asemănător cu timina, unul dintre constituenţii normali ai ADN, pentru a fi încorporat în locul acesteia în molecula de ADN dacă a fost introdus în mediul în care cresc şi se inmulţesc celulele. Introducerea pe această cale în celulă a unor false pietre de construcţie pentru ADN duce la o creştere puternică a frecvenţei mutaţiilor.

S-ar putea obiecta că distorsionarea şi alterarea moleculei de ADN ar putea duce la modificări localizate ale proteinei cu care ADN se află asociat în mod intim şi că aceste modificări secundare ar fi de fapt cauza mutaţiilor observate.

TRANSMITEREA INTACTĂ A ADN ÎN CURSUL DIVIZIUNII CELULARE

ADN poate fi marcat cu elemente radioactive introduse în mediu în timpul sintezei sale. Structurile celulare astfel marcate pot să se „fotografieze" singure dacă sînt puse în contact cu o emulsie fotografică. Această tehnică a fost denumită *autoradiografie*. Pe această cale s-a arătat că ADN din nucleu este transferat celulelor-fiice fără o prealabilă desfacere şi resintetizare a sa. Întrucît dovezile de ordin genetic (cap. 10) arată că genele îşi păstrează individualitatea şi ordinea dispunerii lor de la o generaţie celulară la alta, ipoteza cea mai simplă este aceea că ele sînt constituite dintr-o substanţă care îşi păstrează identitatea şi continuitatea fizică de-a lungul întregului

Scanned with OKEN Scanner

ciclu de viaţă al celulei. Pe de altă parte însă, dacă o experienţă analogă cu histonă marcată ar fi posibilă din punct de vedere tehnic, ea ar putea pune în evidenţă o continuitate asemănătoare.

TRANSFORMAREA LA BACTERII

Dovada directă a rolului genetic al ADN a fost adusă de transmiterea caracterelor ereditare de la o tulpină la alta prin intermediul unor preparate de ADN cu un înalt grad de puritate, fenomen ce poartă numele de transformare bacteriană. Această experienţă a fost realizată pentru prima dată de Avery şi McLeod în 1944, confirmînd observaţiile mult mai vechi ale lui Griffith (1928) care demonstrase că pneumococii pot dobîndi caractere ereditare noi dacă sînt amestecaţi cu germeni morţi aparţinînd unei alte tulpini. Griffith a injectat la şoareci pneumococi vii aparţinînd unei tulpini pure care era lipsită de capsula de polizaharizi caracteristică majorităţii membrilor acestei specii. Întrucît capsula este un factor esenţial de virulenţă, şoarecii respectivi nu au murit. Dacă se inoculau însă şi pneumococi morţi aparţinînd unei tulpini normale, încapsulate, amestecul se dovedea letal iar bacteriile vii izolate de la şoarecii infectaţi erau de tip încapsulat, menţinîndu-se ca atare de-a lungul generaţiilor.

Avery şi McLeod au reuşit să reproducă acest proces utilizînd, în locul corpilor bacterieni morţi, ADN extras din pneumococi încapsulaţi. Nu mai există nici un dubiu asupra faptului că componenta activă a principiului transformat este într-adevăr ADN, şi nu proteina sau urme din vreo altă substanţă ce ar impurifica preparatul, din moment ce activitatea acestuia este suprimată în urma expunerii lui la acţiunea unor enzime care descompun în mod specific ADN.

Se părea deci, la prima vedere, că ipoteza conform căreia ADN constituie baza materială a eredităţii, cel puţin la pneumococi şi la celelalte bacterii la care s-a realizat ulterior transformarea prin ADN, a fost astfel dovedită. Este totuşi semnificativ faptul că, deşi descoperirea lui Avery şi McLeod a fost publicată în 1944, majoritatea geneticienilor au continuat pînă după 1950 să susţină sau cel puţin să încline spre părerea că elementul genetic activ din cromozomi ar fi componenta lor proteică. O analiză critică mai severă scoate, într-adevăr, în evidenţă lipsa unei

Scanned with OKEN Scanner

etape în argumentaţia în favoarea rolului genetic al ADN Fenomenul de transformare bacteriană arată numai că ADN *poate* funcţiona ca vehicul al caracterelor ereditare în anumite condiţii experimentale. El nu dovedeşte că ADN joacă un rol specific în transmiterea acestor caractere de la părinţi la descendenţi în cursul reproducerii normale. Se putea admite părerea că ADN extras ar acţiona ca un mutagen specific, provocînd mutaţia uneia sau mai multor gene ale tulpinii primitoare către formele caracteristice tulpinii donatoare. Genele mutate ar putea fi transmise apoi descendenţilor, fără a exista astfel un motiv care să ne oblige să admitem că genele înseşi sînt constituite din ADN. Pentru a umple acest gol în şirul respectiv de dovezi trebuia să se demonstreze în mod direct că moleculele transformante de ADN care pătrund în celula receptoare sînt încorporate fizic în structura liniară a cromozomului bacterian. Rezultatele studiilor recente asupra procesului de transformare arată că se produce într-adevăr o asemenea încorporare, făcînd ca motivele de îndoială asupra rolului genetic al ADN la bacterii să scadă rapid.

VARIAŢIILE EREDITARE LA VIRUSURI

O altă serie de dovezi asupra naturii chimice a materialului ereditar a rezultat din studiul infectării bacteriilor de către fagi. Am văzut încă din cap. 4 că particula bacteriofagului T_2 este alcătuită dintr-un miez de ADN şi un înveliş de proteină. Primul stadiu al infecţiei constă în fixarea virusului pe suprafaţa bacteriei. ADN viral este apoi injectat în bacterie, părăsind învelişul proteic ce rămîne afară, ataşat de peretele bacteriei sub forma unei „fantome" (fig. 4.11). Cum însă materialul care a pătruns în interiorul gazdei trebuie să conţină informaţia genetică necesară sintezei unor noi generaţii de particule de virus, inclusiv a sintezei învelişurilor proteice ale acestora, rezultă că această informaţie trebuie să fie conţinută în ADN al fagului. Nici acest argument nu este totuşi absolut hotărîtor, întrucît se ştie că o dată cu ADN pătrunde în bacterie şi o mică parte din proteina fagului (1—2% din totalul proteinelor fagice).

Cu virusul mozaicului tutunului s-au obţinut însă rezultate a căror interpretare nu mai este îngreuiată de complicaţiile generate de prezenţa contaminării proteice. Aceste rezultate demonstrează că informaţia necesară pentru sinteza unei proteine

Scanned with OKEN Scanner

specifice *poate fi* purtată de acizii nucleici. Acidul nucleic ce intră în alcătuirea acestui virus este acidul ribonucleic (ARN), şi nu ADN, aşa încît indicaţiile cu privire la poziţia ADN în cadrul eredităţii la organismele superioare este indirectă. Cum însă principalele elemente şi trăsături structurale ale ARN şi ADN sînt comune, după cum se va arăta în capitolul următor, experienţele efectuate cu virusul mozaicului tutunului au contribuit mult la acceptarea ideii că şi ADN poate fi purtător al informaţiei genetice.

Experienţa crucială a constat în extragerea ARN viral în formă pură, urmată de recomplexarea lui cu o proteină virală provenită de la o mutantă a aceluiaşi virus. Cînd cu virusul astfel reconstituit s-a trecut la infectarea unor plante de tutun, s-a constatat că virusul nou apărut prezenta trăsăturile caracteristice tulpinii donatoare de ARN, şi nu ale celei de la care provenise proteina.

STRUCTURA ŞI MODUL PROBABIL DE REPLICARE A ADN

Faptele pe care le-am trecut în revistă pînă acum pot constitui un complex de probe indirecte foarte convingătoare. Ceea ce a contribuit însă în modul cel mai spectaculos la schimbarea orientării în genetica modernă sînt faptele pe care le vom discuta mai jos. Dificultatea alegerii unui candidat pentru rolul de „moleculă directoare" în ereditate provenea din lipsa unei imagini concrete despre modul în care o asemenea moleculă directoare ar putea realiza în acelaşi timp următoarele două atribuţii: de pe o parte, să transmită informaţiile necesare pentru sinteza moleculelor subordonate (enzime, antigene, hormoni etc.) şi, pe de altă parte, să se poată dedubla pe sine însăşi (să se autoreplice) într-un mod ordonat şi corect. Nu s-a emis încă nici o ipoteză concretă cu privire la felul în care o proteină ar putea realiza aceste deziderate. În schimb, în 1953 Watson şi Crick au propus o schemă detaliată a structurii moleculare a ADN, bazată pe analizele chimice efectuate de Chargaff şi pe studiile de difracţie cu raze X ale lui Wilkins şi ale altora. Ei au emis, de asemenea, o ipoteză atrăgătoare cu privire la modul de replicare a ADN, ce decurge în mod firesc din struc-

Scanned with OKEN Scanner

tura propusă de ei. Discutarea amănunţită a acestor probleme va constitui obiectul capitolului următor.

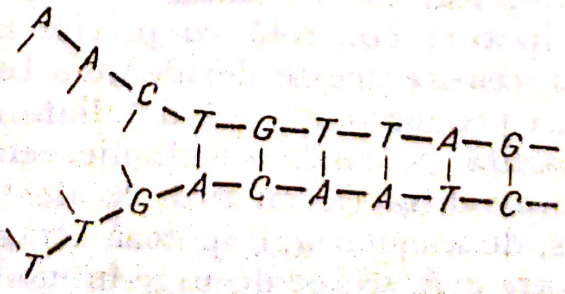
În esenţă, molecula de ADN constă din două lanţuri, în constituţia fiecăruia dintre acestea intrînd cîte o secvenţă de baze purinice şi pirimidinice. Cele patru baze, citozina, guanina, adenina şi timina, sînt rînduite de-a lungul fiecărui lanţ ca mărgelele pe o aţă ; se consideră că succesiunea dispunerii lor în cadrul fiecărui lanţ este cea care determină proprietăţile genetice ale cromozomului. Putem reprezenta deci o jumătate de moleculă de ADN sub forma unui lanţ arătînd cam în felul următor :

$$A-A-C-T-G-T-T-A-G-etc.,$$

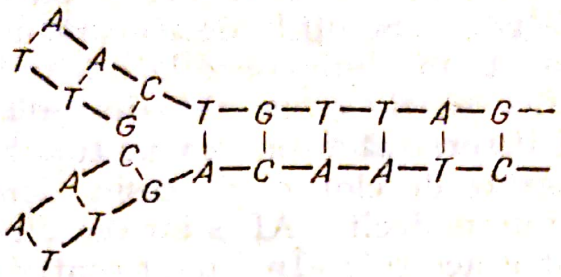
în care *A* înseamnă adenina, *C* — citozină ş.a.m.d. Caracteristica esenţială a moleculei complete constă în aceea că cele două lanţuri care o alcătuiesc sînt ancorate unul de celălalt prin interconexiuni, sub forma unor punţi ce unesc bazele de pe un lanţ cu bazele din dreptul lor de pe celălalt lanţ. Perechile de baze unite în acest fel sînt supuse următoarei condiţii restrictive: adenina nu se poate împerechea decît cu timina, iar citozina numai cu guanina. În consecinţă, jumătatea de moleculă figurată mai sus specifică de fapt în întregime compoziţia în baze a moleculei complete, care va trebui să ia următoarea formă :

$$\begin{array}{l} A-A-C-T-G-T-T-A-G- \\ \quad|\;\;|\;\;|\;\;|\;\;|\;\;|\;\;|\;\;|\;\;| \\ T-T-G-A-C-A-A-T-C- \end{array} \quad etc.$$

Această reprezentare permite conceperea unui mecanism simplu de replicare a moleculei, în aşa fel încît să se păstreze în întregime secvenţa perechilor de baze. Nu trebuie decît să ne imaginăm o scindare longitudinală a moleculei în cele două jumătăţi componente



urmînd ca de bazele, rămase fără partener, ale celor două lanţuri să lege acum baze complementare din mediu, în felul următor:



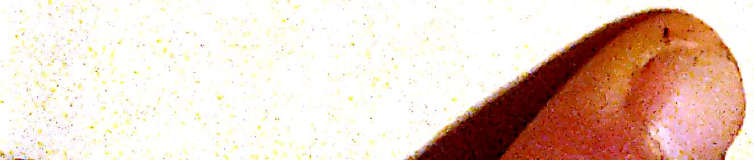
Se asigură astfel automat ca moleculele-fiice să fie replici ale moleculei parentale.

Această schemă a replicării ADN a găsit ulterior un sprijin puternic în cercetările asupra sintezei ADN *in vitro* (cap. 9 şi 12). Ea scoate în evidenţă un element-cheie ce trebuie să caracterizeze orice substanţă care aspiră la titlul de „material genetic", şi anume o modalitate de replicare fidelă a celor mai fine detalii ale structurii sale. Rezultă de aici, ca un corolar, că erorile produse în procesul de copiere (în termeni genetici — „mutaţii") vor putea, o dată apărute, să se replice cu aceeaşi fidelitate; schema de mai sus satisface şi această condiţie.

DOVEZI ÎN FAVOAREA REPLICĂRII SEMICONSERVATIVE

Modul de replicare descris mai sus poate fi definit ca „semiconservativ", în sensul că fiecare moleculă-fiică va consta dintr-o jumătate de moleculă provenită din molecula parentală, cealaltă jumătate fiind asamblată din elemente furnizate de mediu. Toate experienţele destinate să pună în evidenţă un mecanism semiconservativ al sintezei ADN întăresc argumentele expuse în paragraful anterior şi ca atare sprijină cazul general.

Demonstrarea cea mai simplă şi mai convingătoare a existenţei unui asemenea mecanism este aceea realizată de Meselson şi Stahl care au lucrat cu *E. coli*, bacterie care abundă în conţinutul intestinal. Ei au cultivat acest microorganism într-un mediu în care tot azotul fusese înlocuit cu izotopul greu al acestuia, ^{15}N, pînă cînd o substituire similară s-a produs şi în toţi constituenţii bacteriilor, inclusiv în ADN. ADN marcat cu azot greu a fost apoi extras din bacterii şi amestecat cu ADN provenit



din același tip de bacterii cultivate într-un mediu normal. S-a constatat că este posibilă o separare satisfăcătoare a celor două componente din amestec prin centrifugare puternică într-o soluție de clorură de cesiu. Soluțiile de clorură de cesiu folosite în aceste experiențe au fost preparate la o astfel de concentrație, încît densitatea lor să fie asemănătoare cu a ADN. Centrifugarea puternică determină formarea în tubul respectiv a unui gradient de densitate de clorură de cesiu, densitatea la fundul tubului fiind mai mare decît a ADN iar cea dinspre gura tubului mai scăzută decît a acestuia. În cursul centrifugării, moleculele de ADN ajung la un echilibru undeva de-a lungul tubului, acolo unde densitatea lor este egală cu cea din zona respectivă a soluției de clorură de cesiu.

În experiența lui Meselson și Stahl, ADN „greu" s-a plasat mai către fundul tubului de centrifugă decît ADN normal, fiecare formînd cîte un strat distinct și net delimitat, după cum indică prima parte din fig. 8.1. Etapa crucială a experienței a constat în retransferarea bacteriilor marcate pe un mediu normal pentru un timp astfel ales, încît să aibă loc un singur ciclu de diviziuni celulare, după care ADN a fost din nou extras și centrifugat după tehnica descrisă. În acest caz s-a format un singur strat, alcătuit dintr-un material cu o densitate care îl făcea să se situeze la jumătatea distanței dintre ADN „greu" și cel normal. Cu alte cuvinte, luaseră naștere molecule „hibride",

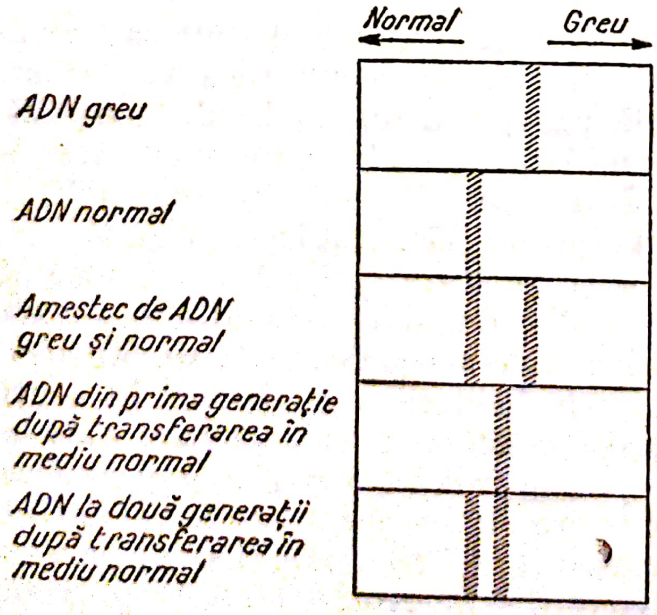
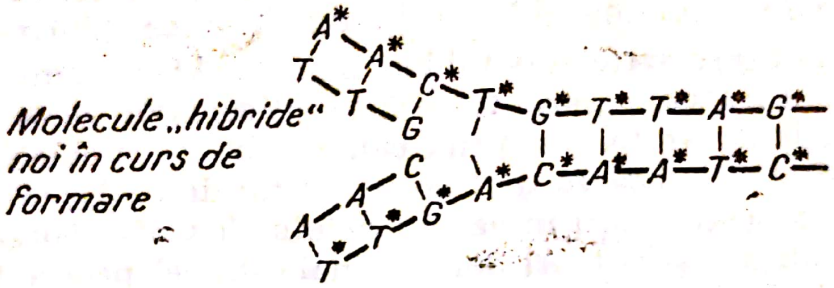


Fig. 8.1. Experiența lui Meselson-Stahl. Pentru explicații, vezi text.

Scanned with OKEN Scanner

exact jumătate din fiecare fiind alcătuită din material provenit de la vechiul ADN, „greu", cealaltă jumătate fiind reprezentată de un material nou, nemarcat, format din precursorii existenţi în mediu. Este exact ceea ce prezicea ipoteza mecanismului semiconservativ ilustrat în schemele de mai sus, dintre care ultima poate fi desenată din nou după cum urmează, folosind asteriscul pentru a indica materialul marcat cu azot greu:



O confirmare suplimentară a fost obţinută cînd s-a lăsat ca în mediul normal să se desfăşoare *două* generaţii de diviziuni celulare. De data aceasta, ADN extras a dat naştere la două straturi separate, fiecare dintre ele conţinînd jumătate din ADN total; unul dintre acestea corespunde ADN „hibrid" ca mai înainte, celălalt cuprindea ADN nemarcat. Cercetînd ultima schemă, cititorul se poate convinge că, într-adevăr, pentru al doilea ciclu de replicare acesta era rezultatul aşteptat. Principalele elemente ale acestei experienţe elegante sînt rezumate în fig. 8.1.

Pentru a putea aprecia în întregime ponderea dovezilor aduse de Meselson şi Stahl, să încercăm să ne imaginăm rezultatul care ar fi fost obţinut dacă replicarea ADN *nu* ar fi fost de tip semiconservativ. Dacă ea ar fi *total* conservativă, în prima generaţie ar trebui să se formeze cantităţi egale de ADN „greu" şi normal, şi nu un ADN cu densitate intermediară. Dacă replicarea nu ar fi nici totală, nici semiconservativă şi lanţurile iniţiale de baze, complet marcate, s-ar fragmenta în cursul replicării, ar rezulta, ca o consecinţă obligatorie, obţinerea în moleculele-fiice a unui amestec de baze grele şi uşoare. Nu ar mai fi posibilă reconstituirea celor două tipuri distincte întîlnite în cantităţi egale în a doua generaţie de germeni din experienţa lui Meselson şi Stahl.

Ulterior, au fost obţinute rezultate similare cu celule de metazoare, inclusiv cu celule umane în culturi de ţesut.

Din datele citate se poate trage cu destulă certitudine concluzia că, la organismele superioare, informația genetică își are sediul în primul rînd în ADN cromozomial, astăzi fiind unanim admisă concepția după care această informație este înscrisă sub forma unui „cod" în secvența de baze a acizilor nucleici. Cercetarea mecanismului de sinteză a proteinelor (discutat în cap. 12) aduce noi dovezi în sprijinul validității acestei concepții.

S-a conturat astfel un tablou în care ADN ocupă locul de moleculă directoare care transmite informația de-a lungul a două canale separate. Un prim canal duce de la ADN la ADN. El asigură continuitatea de la o generație de celule la alta și de la părinți la descendenți în cadrul ciclului de viață al organismului întreg și nu are sfîrșit. Al doilea canal este cel prin intermediul căruia ADN din cromozomi controlează activitățile metabolice ale celulei. Mai precis, ADN controlează de fapt sinteza proteinelor; după cum s-a subliniat în cap. 2, proteinele, acționînd ca enzime, controlează la rîndul lor celelalte activități metabolice. Ca atare, acest al doilea canal duce de la ADN la proteină (prin intermediul ARN, după cum se va vedea în cap. 12). Prin aceasta înțelegem că ADN specifică secvențele precise ale aminoacizilor ce constituie diferitele proteine. Problema modului în care o secvență construită din numai patru baze diferite poate specifica în mod neechivoc o secvență alcătuită din douăzeci de aminoacizi diferiți este cunoscută drept „problema codului" și va fi discutată mai amănunțit în cap. 12. Pentru ceea ce ne preocupă aici este suficient să acceptăm existența a două canale distincte de transmisie: de la ADN la ADN de-a lungul liniei germinative și de la ADN la proteină prin ADN și ARN al celulelor somatice. Schema originală a lui Weissman, prelucrată potrivit concepțiilor moderne în fig. 7.1, poate fi deci exprimată în termeni chimici după cum se vede în fig. 8.2.

Această schemă este supusă unor rezerve analoge celor ridicate în legătură cu versiunea inițială a schemei lui Weissman: ea nu admite posibilitatea nici unui efect modificator al mediului înconjurător asupra acțiunii genelor. Cît timp este vorba de transmiterea caracterelor ereditare de la o generație la alta, nu ar fi de formulat vreo rezervă importantă. Weissman însuși a tăiat cozile unor șoareci de-a lungul a 20 de generații și a

Scanned with OKEN Scanner

constatat că în cea de a 21-a generaţie lungimea cozii nu scăzuse. Experienţa sa era grosolană, dar concluziile sale au fost în general confirmate de cercetările ulterioare: este mai degrabă o rară excepţie şi nu regulă ca factorii din mediul înconjurător să provoace modificări dirijate ale patrimoniului ereditar transmis la descendenţi, deşi modificări *nedirijate*, cunoscute sub numele de mutaţii, pot fi, bineînţeles, determinate de factori din mediu. În schimb, dacă analizăm un alt aspect al eredităţii, cel prin care potenţialităţile genetice sînt transmise de la celula-mamă la celula-fiică în cadrul unui organism multicelular diferenţiat, observăm că schema din fig. 8.2 este incompletă şi că se simte nevoia includerii unui al treilea canal de transmitere a informaţiei. Canalul absent este cel care determină apariţia diferenţierii între diversele linii celulare ce provin din acelaşi ovul fecundat, fiecare linie dobîndind caracteristicile proprii unui anumit ţesut specializat din cadrul organismului ajuns la dezvoltare

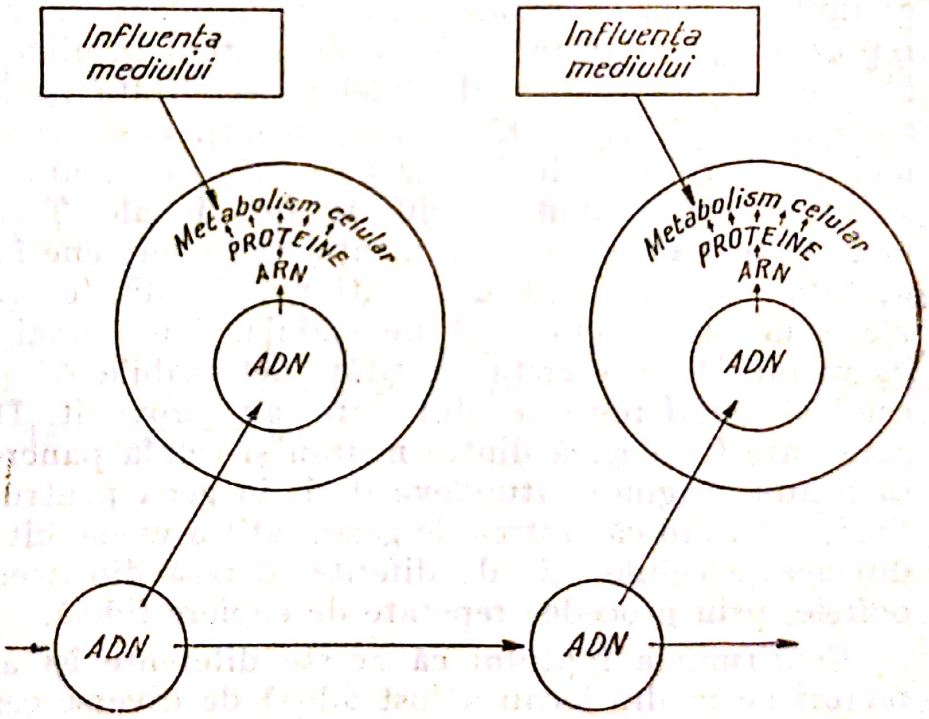


Fig. 8.2. Schemă ilustrînd cele două canale ale fluxului de informaţie: de la ADN la ARN de-a lungul „liniei germinative" şi de la ADN la proteină prin ADN şi ARN al celulelor somatice.

completă. Întrucît din natura diviziunii mitotice rezultă ca o consecinţă faptul că celulele unor ţesuturi diferite seamănă perfect între ele din punctul de vedere al conţinutului lor în gene şi cromozomi, rezultă că trebuie să existe un canal de transmitere

Scanned with OKEN Scanner

a unor influenţe care să decidă care anume gene din setul complet existent vor fi active într-o celulă dată.

În ultimă analiză, factorii de diferenţiere trebuie să se nască în urma interacţiunii dintre mediul înconjurător pericelular şi constituenţii celulei. Trebuie să presupunem că aceşti factori, deşi sînt incapabili să influenţeze transmisia de-a lungul canalului ADN—ADN, pot totuşi exercita o influenţă selectivă asupra *debitului de scurgere* a informaţiei pe cel de-al doilea canal, de la ADN la proteină. Structura detaliată a fiecărei proteine pe care organismul este capabil să o sintetizeze este specificată de un segment corespunzător din ADN (cap. 10), dar o serie de factori nucleari, citoplasmatici şi de mediu au cu toţii un cuvînt de spus pentru a decide care anume proteine din întreaga gamă posibilă vor fi sintetizate într-o celulă dată şi care va fi dinamica acestei sinteze.

Să ne închipuim un anumit segment de ADN existent într-un anumit cromozom uman şi să presupunem că acest segment reprezintă gena răspunzătoare de sinteza insulinei. Pentru a se ajunge ca, exceptînd cazul celulelor specializate insulino-secretoare ale pancreasului, această genă să nu iniţieze sinteza de insulină în nici un alt tip de celulă în care se află, e necesar ca această genă să sufere aici anumite modificări funcţionale. Trebuie să existe mecanisme care să asigure menţinerea unei gene în „stare deconectată" şi, mai mult decît atîta, în ereditatea celulei această stare de deconectare să fie stabilă. Nu numai neuronii sînt incapabili de a secreta cantităţi detectabile de insulină, ci şi celulele nediferenţiate din care au provenit. Deosebirile de activitate fiziologică dintre neuron şi celula pancreatică trebuie să-şi aibă originea altundeva decît în gena pentru sinteza insulinei, dat fiind că zestrea de gene, atît a uneia, cît şi a celeilalte din aceste celule atît de diferite, derivă din aceeaşi celulă de obîrşie, prin procedee repetate de copiere fidelă.

Confirmarea faptului că aceste diferenţe îşi au originea în factori de mediu locali a fost adusă de diverse cercetări clasice de embriologie experimentală. Spre exemplu, un fragment de ţesut ectodermic ce urmează să se transforme pînă la urmă în piele poate fi transplantat într-o zonă în care urma ca mai tîrziu să se dezvolte în embrion sistemul nervos. Dacă transplantarea a fost efectuată înainte ca ţesutul respectiv să fi trecut de o anumită etapă a diferenţierii sale, transplantul va fi deviat

Scanned with OKEN Scanner

spre noua linie de diferenţiere, corespunzătoare noului său mediu înconjurător, şi se va transforma în ţesut nervos. O dată consolidate, aceste schimbări se fixează în ereditatea celulei. Astfel, dacă la un adult se foloseşte ţesutul cornean al unui ochi pentru a înlocui o bucată de piele excizată de pe torace, transplantul îşi păstrează însuşirile specifice, inclusiv transparenţa. S-ar putea argumenta că fenomenele de diferenţiere ar putea fi controlate de un sistem de determinanţi pur citoplasmatici, independent de activităţile genelor din nucleu şi lipsit de orice influenţă asupra acestora. Punctul de vedere modern este însă puternic influenţat de mecanismele cunoscute de formare a enzimelor adaptative la microorganisme, discutate în cap. 10. Studii asupra acestei probleme arată că o genă poate fi ,,conectată'' şi ,,deconectată'' ca rezultat al unor procese metabolice care se petrec în citoplasmă, fără a suferi însă o modificare structurală de tipul celor pe care le presupune o mutaţie. Cercetări recente ale lui Gurdon au demonstrat că oricare ar fi modificările de *funcţie* ale unei gene ce apar în cursul diferenţierii unui metazoar, nucleul unei asemenea celule diferenţiate este capabil să păstreze întregul bagaj de informaţie genetică ce era prezent în ovulul fecundat. Lucrînd cu broaşte *Xenopus*, el a putut obţine animale adulte din ouă anucleate în care a injectat nuclee ale unor celule diferenţiate provenind din epiteliul intestinal al unor mormoloci capabili să se hrănească singuri.

În cap. 10 şi 12 vom discuta modul în care manifestarea genelor depinde de interacţiunea dintre ADN şi ARN. În capitolul ce urmează vom analiza structura şi proprietăţile celor două tipuri de acizi nucleici.

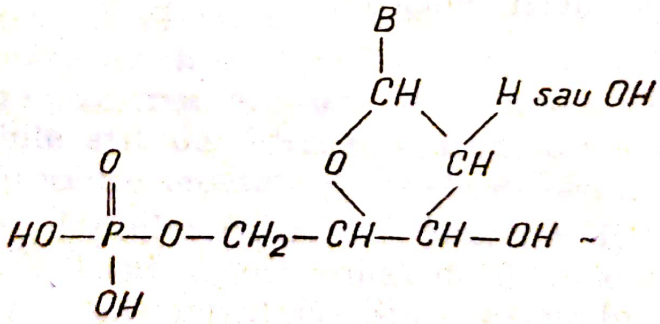
Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 9

STRUCTURA ACIZILOR NUCLEICI ȘI A NUCLEOPROTEINELOR

Forțele care determină interacțiunea dintre moleculele de acizi nucleici, precum și interacțiunea acestora cu proteinele sînt asemănătoare cu cele implicate în interacțiunea dintre moleculele proteice: legăturile de hidrogen, factorii de hidrofobie și forțele electrostatice, prezentate și analizate în cap. 3. Pentru a evita repetarea în mare măsură a celor spuse atunci, scopul capitolului de față nu este de a servi singur drept introducere în studiul proprietăților acizilor nucleici, ci constituie o continuare a cap. 3. În felul acesta vom putea analiza mai întîi, pe scurt, proprietățile acizilor nucleici înșiși, trecînd apoi la discutarea mai pe larg a interacțiunii lor cu proteinele.

Moleculele de acizi nucleici sînt constituite din lanțuri lungi alcătuite prin legarea între ele a unor unități denumite *nucleotizi*, care au următoarea formulă generală:

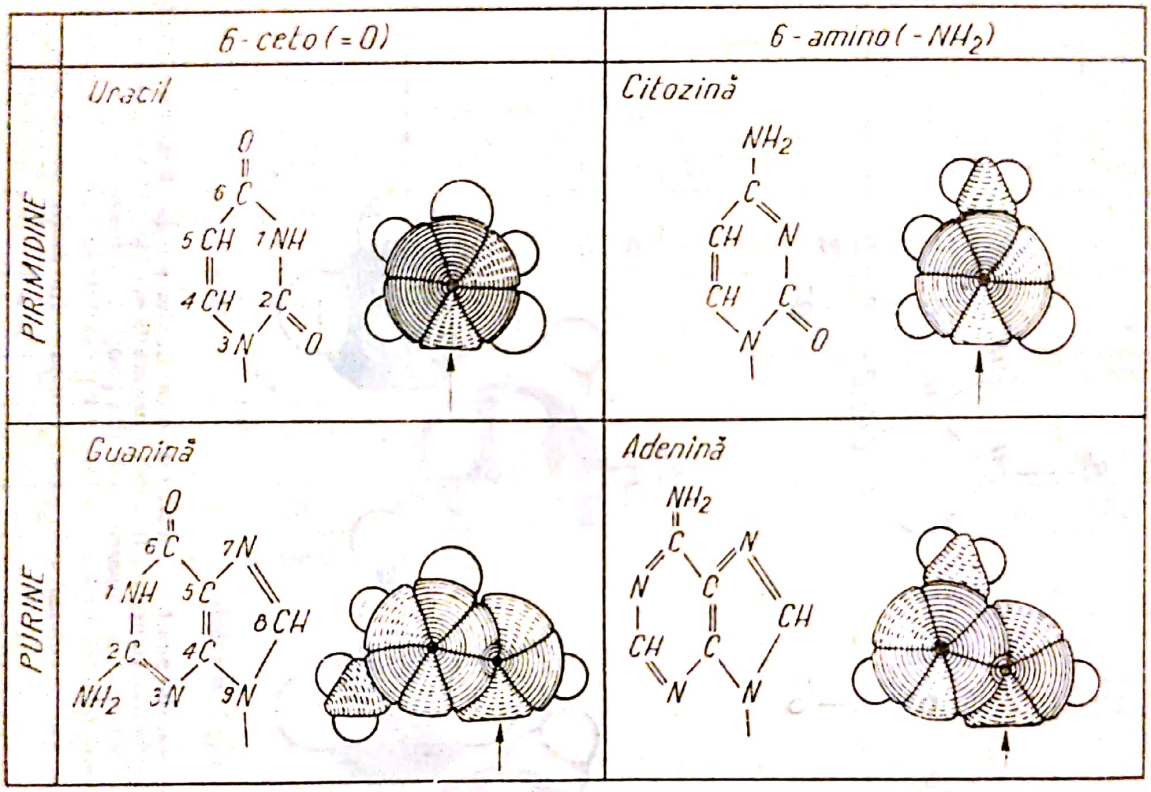


în care *B* reprezintă una dintr-o serie de *baze*. Bazele cel mai curent întîlnite în acizii nucleici naturali sînt reunite în tabelul 9.1. În fig. 9.1 este prezentat scheletul *acidului ribonucleic* (ARN), cu alternanța sa de grupări fosfatice și de inele glucidice

TABELUL 9.1.

Formulele chimice și desenele unor modele moleculare ale bazelor nucleotidice

Săgețile indică orificiile în care se adaptează „țărușii" desenați pe modelul scheletului de acid nucleic din fig. 9.1. În cazul 5-metil-uracilului (timină) și 5-metil-citozinei, hidrogenii din poziția 5 sînt înlocuiți cu o grupare metilică —CH_3. În 5-hidroximetil-citozină, hidrogenul din poziția 5 este înlocuit printr-o grupare hidroximetilică (—CH_2OH) iar în 5-glicozil-hidroximetil-citozină de această grupare hidroximetilică se află legat un inel de glucoză. În 5-ribozil-uracil („pseudo-uracil"), inelul uracilului este legat de riboza din structura scheletului prin carbonul din poziția 5 a ciclului uracilic în loc să fie legat prin azotul din poziția 3.



de riboză, fiind ilustrat modul în care sînt legați între ei nucleotizii ce formează lanțurile de acizi nucleici. În molecula completă de acid nucleic, pe scheletul acesta, în punctele marcate prin „țărușii" B_1, B_2 ... este fixată cîte una dintre bazele cuprinse în tabelul 9.1. În acidul *dezoxiribonucleic* (ADN), gruparea—OH din poziția 2′ a fiecărui ciclu glucidic (fig. 9.1) este înlocuită printr-un hidrogen (—H).

Bazele ce se găsesc în acizii nucleici naturali sînt de patru tipuri (tabelul 9.1): 6-aminopirimidine și 6-ceto-sau 6-aminopurine. Toate cele patru tipuri de baze există în cantități apreciabile în toți acizii nucleici naturali (tabelul 9.2), cu men-

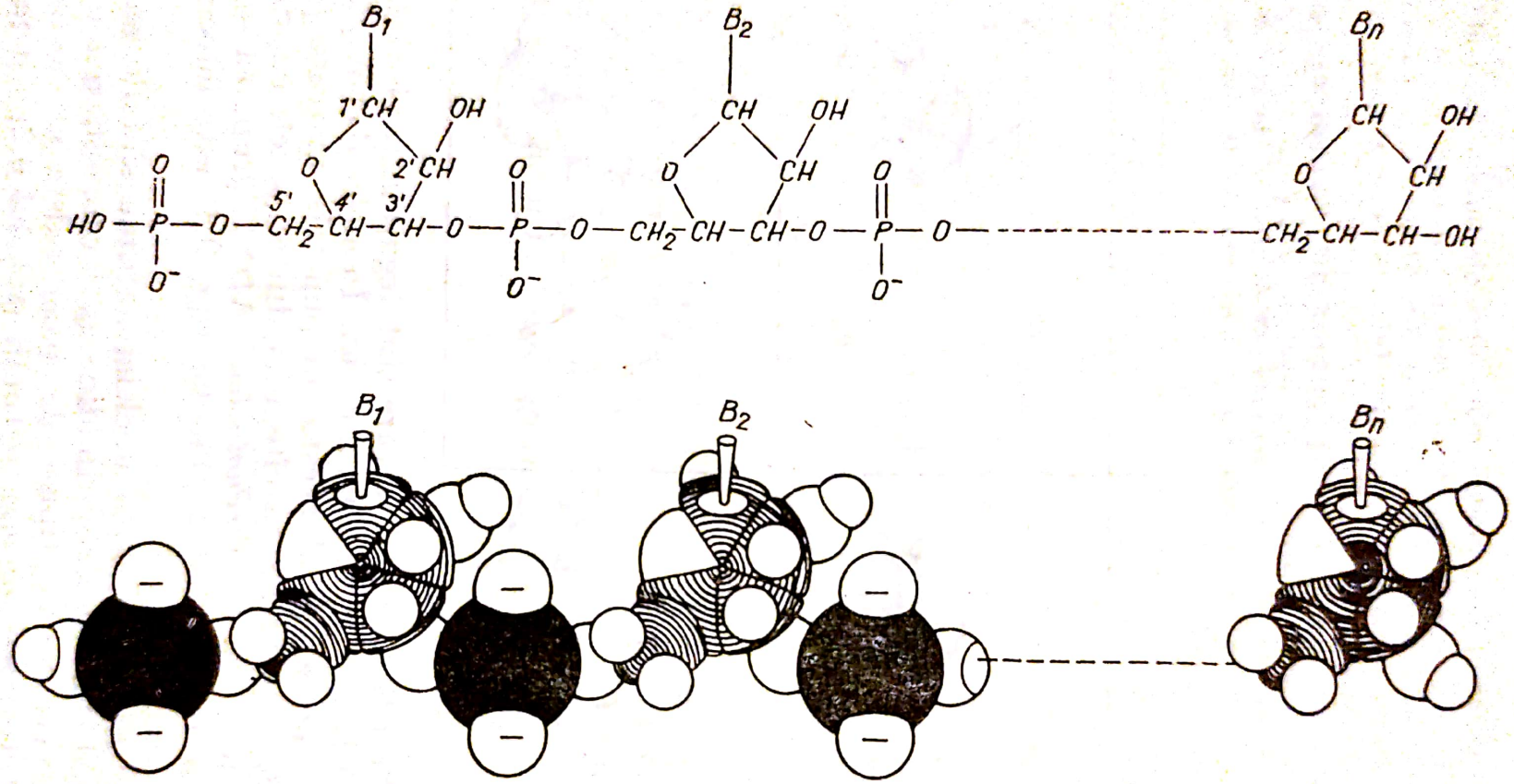


Fig. 9.1. Scheletul unui lanţ de acid nucleic.

În acidul ribonucleic (ARN) reprodus în această figură scheletul este alcătuit din grupări fosfatice alternînd cu inelele glucidului riboză. (Ca şi în desenele anterioare, atomii de fosfor sînt figuraţi în negru.) În acidul dezoxiribonucleic (ADN), scheletul este reprezentat de grupări fosfatice alternînd cu inelele glucidului *dezoxiriboză*, în care gruparea —OH din poziţia 2′ a fiecărui ciclu pentozic este înlocuită cu hidrogen (—H). „Ţăruşii" marcaţi cu B_1, B_2 ... B_n reprezintă punctele de legare a *bazelor* reprezentate în tabelul 9.1. În lanţul complet al unui acid nucleic, în punctele respective (poziţia 1′ de pe fiecare ciclu pentozic) este legată una sau alta dintre aceste baze.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 9.2 Compoziția în baze a acizilor nucleici (%)

	Adenină	Guanină	Citozină	5—metil—citozină	5—hidroximetil citozină	5—glucozil—hidroximetil-citozină	Uracil	5-metil-uracil (timină)	5-ribozil-uracil	Purină / Pirimidină	6-amino / 6-ceto
ADN din timus de bou (1)	28	22	21	1	0	0	0	28	0	1,00	1,00
ADN din sperma de hering (1)	28	20	21	3	0	0	0	28	0	0,92	1,08
ADN din germene de grîu (1)	27	23	17	6	0	0	0	27	0	1,00	1,00
ADN din drojdie (1)	31	19	17	0	0	0	0	33	0	1,00	0,92
ADN din *E. coli* (1)	26	25	25	0	0	0	0	24	0	1,04	1,04
ADN din fagul T_2 (1,2)	32	18	0	0	3	14	0	33	0	1,00	0,96
ARN mesager specific fagului T_2 (8)	28	21	16	0	0	0	35	0	0	0,96	0,79
ARN solubil specific fagului T_2 (8)	27	22	16	0	0	0	35	0	0	0,96	0,75
ADN din fagul T_5 (1)	31	19	19	0	0	0	0	31	0	1,00	1,00
ARN din ouă de arici de mare (3)	23	29	27	0	0	0	21	0	0	1,08	1,00
ARN din drojdie (3)	25	25	23	0	0	0	27	0	0	1,00	0,92
ARN nuclear din ficat de iepure (3)	18	22	33	0	0	0	27	0	0	0,67	1,04
ARN din VMT (4)	28	26	20	0	0	0	26	0	0	1,17	0,92
ADN din ØX174 (5)	25	24	18	0	0	0	0	33	0	0,96	0,75
ARN ribozomal din ficat de iepure (6)	19	32	29	0	0	0	20	0	0	1,04	0,92
ARN solubil din ficat de iepure (6)	20	29	29	0	0	0	18	0	4	0,96	0,96
ARN ribozomal din *E. coli* (6)	25	31	23	0	0	0	21	0	0	1,27	0,92
ARN solubil din *E. coli* (6)	20	31	29	0	0	0	19	0	1	1,04	0,96
ARN din VMGN (7)	23	17	38	0	0	0	22	0	0	0,67	1,56

[1] Davidson, J. N., *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, ed. a 4-a, London Methuen, 1960.
[2] Jesaitis, M. A., "Nature", London, *178*, 637, 1956.
[3] Elson, D., și Chargaff, E., "Biochim. biophys. Acta", *17*, 367, 1955.
[4] Loring, H.S., în *The Nucleic Acids*, sub red. E. Chargaff și J. N. Davidson, Academic Press, 1955.
[5] Sinsheiner, R. L., "J. mol. Biol. ", *1*, 43, 1959.
[6] Osawa, S., "Biochim. biophys. Acta", *42*, 244, 1960.
[7] Markham, R. și Smith, J. D., "Biochem. J.", *49*, 401, 1951.
[8] Nomura, M., Hall, B. D. și Spiegelman, S., "J. mol. Biol.", *2*, 306, 1960.

Scanned with OKEN Scanner

ţiunea că 6-cetopirimidina din ARN este uracilul, în timp ce în ADN aceasta este reprezentată prin 5-metil-uracil (timină). În ADN se găseşte rareori uracil, după cum în ARN timina se întîlneşte rar sau de loc. Se observă o regularitate în ceea ce priveşte proporţiile relative ale diferitelor baze. În ADN provenit din aproape toate sursele, precum şi în ARN de anumite provenienţe, purinele şi pirimidinele se găsesc în proporţii egale, tot aşa cum proporţia de 6-ceto-nucleotizi este egală cu cea de 6-amino-nucleotizi (tabelul 9.2). Rezultă că în aceşti acizi nucleici numărul nucleotizilor de tipul adeninei (6-amino-purină) este egal cu al celor de tipul uracilului (6-ceto-pirimidina), iar numărul celor de tipul guaninei (6-ceto-purină) este egal cu al celor de tipul citozinei (6-aminopirimidină). Semnificaţia acestor raporturi va putea fi înţeleasă în momentul în care, în paragrafele ulterioare, vom analiza structura tridimensională a acizilor nucleici.

Greutăţile moleculare ale preparatelor de ARN purificate variază de la 20 000 la 2×10^6, ceea ce corespunde unor lanţuri de aproximativ 60 pînă la 6 000 de nucleotizi. Greutăţile moleculare ale ADN purificat sînt de ordinul a 100 000 pînă la 120×10^6; dat fiind însă că moleculele de ADN foarte mari pot fi rupte relativ uşor în cursul manoperelor utilizate pentru extragerea lor, este posibil ca *in vivo* greutăţile lor moleculare să depăşească aceste cifre.

Numărul diferitelor tipuri de baze din acizii nucleici este mult mai mic decît numărul tipurilor diferite de aminoacizi din proteine. Aceasta face ca determinarea structurii *primare*, adică a secvenţei nucleotizilor de-a lungul lanţului de acizi nucleici, să fie mult mai anevoioasă decît rezolvarea aceleiaşi probleme în cazul unui lanţ peptidic; fragmentele unui lanţ lung de acid nucleic nu pot fi deosebite unul de altul cu aceeaşi uşurinţă ca fragmentele unui lanţ peptidic. Progresele făcute în acest important domeniu sînt foarte reduse. Dacă acizii nucleici sînt principalii purtători ai informaţiei genetice (cap. 8), dar se deosebesc puţin între ei din punctul de vedere al compoziţiei în baze (tabelul 9.2), înseamnă că individualitatea unei molecule de acid nucleic dat trebuie să rezide în secvenţa precisă a nucleotizilor de-a lungul lanţului. Corelaţia dintre secvenţa şi proprietăţile genetice rămîne o problemă care, deşi fascinantă, nu este încă decît în parte dezlegată (cap. 12).

Cantitatea de ADN dintr-o celulă de mamifer corespunde

Scanned with OKEN Scanner

unui număr de aproximativ 25 000 de molecule cu o greutate moleculară de 120×10^6, ceea ce reprezintă un total de aproximativ 10 miliarde de nucleotizi.

STRUCTURA DUBLELOR SPIRALE DE ADN

Studiul propietăţilor fizico-chimice şi optice ale soluţiilor de ADN obţinute din majoritatea surselor arată că moleculele acestuia sînt fire lungi, subţiri şi relativ rigide. După cum vom vedea, pe baza studiilor de difracţie cu raze X, se apreciază că diametrul lor este de aproximativ 2 mμ; lungimea lor, studiată în preparate de microscopie electronică, poate atinge 30μ sau chiar mai mult. Diferite tratamente, cum ar fi ridicarea temperaturii soluţiei de ADN, modificarea *p*H-ului dincolo de anumite limite sau scăderea concentraţiei de săruri cu mult sub concentraţia fiziologică, sînt urmate de modificări interesînd atît proprietăţile fizico-chimice ale soluţiei, cît şi rotaţia optică şi absorbţia de radiaţii ultraviolete. Trebuie să se admită că lanţurile de acizi nucleici din ADN nativ nu se găsesc într-o formă încolăcită la întîmplare, complet flexibilă, ci sînt dispuse într-o structură tridimensională bine definită în cadrul moleculei filiforme; în anumite condiţii, această structură poate fi dezmembrată, acizii nucleici suferind un proces de denaturare analog celui întîlnit la proteine. Extinzînd terminologia utilizată în cazul proteinelor, putem vorbi despre încolăcirea şi înfăşurarea lanţurilor din cadrul moleculei de acid nucleic ca reprezentînd structura *secundară* a moleculei.

Pe baza analizei birefringenţei de scurgere a soluţiilor de ADN şi a studiilor de difracţie cu raze X, Astbury şi Bell au arătat, încă din 1938, că bazele din molecule de ADN trebuie să fie astfel dispuse, încît planul lor să fie orientat perpendicular pe axul lung al moleculei, fiind probabil stivuite unele peste altele „ca un teanc de farfurii". Progresele ulterioare înregistrate în elucidarea structurii secundare a moleculei au fost minore pînă în 1952—1953, cînd au cunoscut un salt spectacular. În acel moment fusese de-abia stabilită structura chimică detaliată a scheletului acizilor nucleici, reprezentată în fig. 9.1, iar studiile de difracţie cu raze X efectuate pe cristale de nucleotizi furnizaseră date precise asupra lungimii şi unghiurilor legăturilor chimice din interiorul lor, ceea ce a permis construirea unor modele moleculare corecte, la scară, ale lanţurilor de acizi

Scanned with OKEN Scanner

nucleici şi stabilirea, spre exemplu, a orientării celei mai probabile a inelelor glucidice din cadrul scheletului. În 1952, Fulberg a propus, în mod pur speculativ, două structuri posibile ale moleculei de ADN, pe baza înfăşurării sau îndoirii unui singur lanţ de acid nucleic: într-unul din aceste modele, bazele erau aşezate unele peste altele, alcătuind o coloană lungă, scheletul înfăşurîndu-se în spirală pe faţa ei externă. Un alt model, de asemenea speculativ, a fost propus de Pauling şi Corey la începutul anului 1953, ei postulînd răsucirea împreună a trei lanţuri cu formarea unei spirale lungi, bazele fiind orientate în afara unui miez central alcătuit din grupurile fosfatice ale scheletului.

Între timp, Wilkins, Franklin şi alţi cercetători de la „King's College" din Londra, recurgînd la prepararea unor fire trase din masa unor soluţii concentrate de ADN, în condiţii de umiditate strict controlate, au reuşit să obţină preparate de molecule deosebit de regulat ordonate, într-o formă cvasicristalină, care le-au permis obţinerea unor spectre de difracţie cu raze X mult mai amănunţite decît fuseseră cele ale lui Astbury şi Bell. Aceste spectre erau asemănătoare cu cele reproduse în fig. 3.15, deşi în acea perioadă prezentau mai puţine detalii. Cercetările lor au început să aducă dovezi directe asupra caracterului spiralat al moleculei de ADN şi să indice, în contradicţie cu postulările lui Fulberg şi ale lui Pauling şi Corey, că molecula conţine două lanţuri răsucite împreună, avînd grupările fosfatice dispuse de jur împrejurul şi la exteriorul unui helix cu un diametru de aproximativ 2 mμ şi bazele orientate înăuntru către axul central al moleculei.

În 1951, Chargaff a pus în evidenţă faptul că în ADN provenit din toate sursele analizate pînă atunci bazele purinice şi pirimidinice, precum şi bazele 6-cetonice şi 6-aminice, se găseau în proporţii egale (tabelul 9.2). Sesizînd semnificaţia posibilă a rezultatelor lui Chargaff şi cunoscînd puţinele date ce începeau să izvorască din studiile de difracţie cu raze X efectuate la „King's College", Watson şi Crick au trecut la examinarea, pe modele moleculare, a modurilor posibile de înfăşurare a lanţurilor de ADN, ajungînd astfel la elaborarea răsunătorului şi spectaculosului model propus de ei pentru structura moleculei de ADN. Ei au arătat că se poate ajunge la o structură regulată alcătuită din două lanţuri de acizi nucleici răsuciţi împreună într-o dublă spirală, dacă se realizează peste tot împerecherea, prin intermediul unor legături de hidrogen, a

Scanned with OKEN Scanner

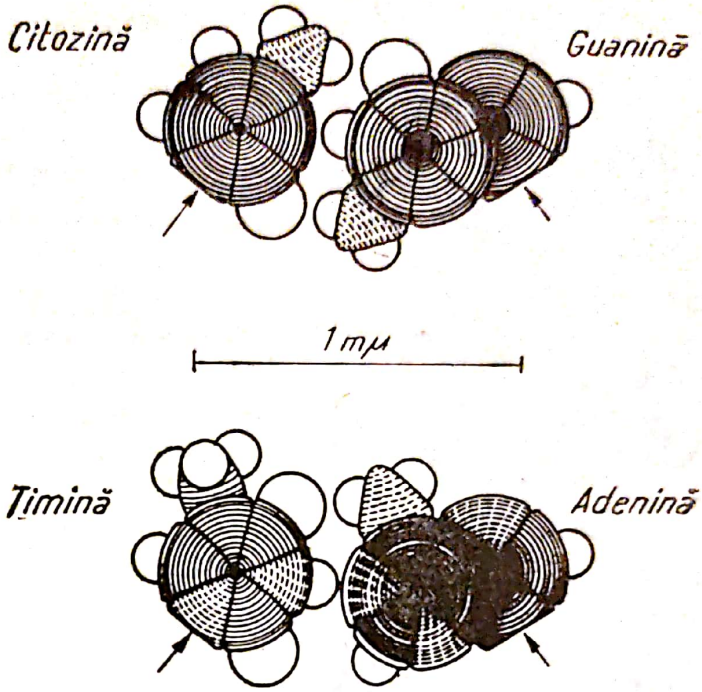


Fig. 9.2. Perechile de baze, care, conform ipotezei lui Watson şi Crick, trebuie să se formeze în molecula de ADN cu dublu helix.

Săgeţile indică locurile de legare a bazelor pe scheletul celor două lanţuri de acizi nucleici răsuciţi împreună. Distanţa dintre punctele de legare este aceeaşi pentru ambele perechi de baze (1,1 mμ). Între timină şi adenină se formează două legături de hidrogen, iar între citozină şi guanină — trei. Uracilul poate fi legat de adenină în acelaşi mod ca şi timina (a se compara acest desen al timinei cu cel al uracilului din tabelul 9.1).

bazelor adenină cu timină (5-metil-uracil) şi a bazelor guanină şi citozină (fig. 9.2).

Acest dublu helix este reprezentat în fig. 9.3. Lanţurile de grupări fosfatice şi inelele glucidice ale scheletului se înfăşoară în spirală pe suprafaţa exterioară a unei structuri ce are forma unei baghete lungi. Miezul baghetei este constituit din perechile de baze reprezentate în fig. 9.2, suprapuse, aşa cum presupuseseră Astbury şi Bell, „ca o stivă de farfurii". Fiecare pereche de baze din cadrul helixului este rotată în jurul axului cu aproximativ 36° faţă de perechea aşezată imediat dedesubt, ceea ce face ca fiecărei spire complete a dublului helix să-i corespundă aproximativ 10 perechi de baze.

Împerecherea specifică a bazelor din cadrul acestei structuri concordă, bineînţeles, cu regularitatea compoziţiei de baze a ADN descrisă anterior. Watson şi Crick au arătat că structura dublu spiralată ar asigura, de asemenea, în principiu, un mecanism de duplicare a materialului genetic, întrucît, dacă cele două lanţuri ar fi separate, fiecare dintre ele ar putea funcţiona ca „tipar" pentru formarea unui lanţ complementar, în felul acesta luînd naştere două copii ale dublului helix original. (Acest proces este reprezentat schematic în cap. 8).

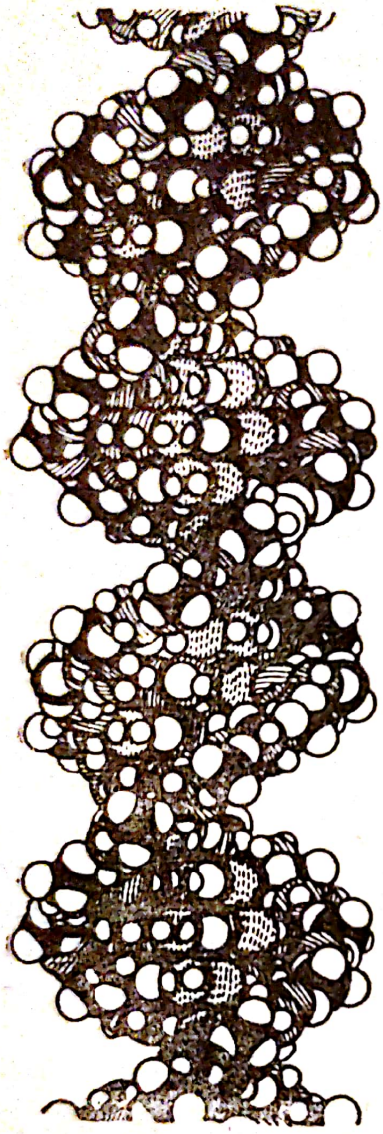


Fig. 9.3. Moleculă dublu elicoidală de ADN, formată prin răsucirea împreună a două lanţuri de ADN ale căror secvenţe de baze sînt complementare (conform definiţiei din cap. 8).

Perechile de baze din fig. 9.2. sînt stivuite ca un „teanc de farfurii" în centru, iar scheletele celor două lanţuri se înfăşoară în spirală în jurul acestui miez central. De remarcat alternanţa de şanţuri adînci şi mai puţin adînci care ia astfel naştere. Distanţa la care se repetă perechile de baze de-a lungul axului moleculei este de aproximativ 3,4 Å (după Feughelman şi colab., 1955).

Ipoteza lui Watson şi Crick asupra modului de duplicare a materialului genetic, atît de simplă în esenţă, dar atît de profundă şi de importantă prin implicaţiile sale pentru genetică şi teoria evoluţiei, a incitat bineînţeles un mare număr de lucrări experimentale şi de speculaţii teoretice. Toate indicaţiile existente arată că ipotezele lor sînt în esenţă corecte. O parte dintre aceste argumente au fost discutate în cap. 8, urmînd să analizăm aici doar datele furnizate de metoda difracţiei cu raze X şi alte dovezi mai directe.

Perfecţionarea metodelor de analizare cu ajutorul difracţiei cu raze X a extractelor de ADN a dus la unele modificări

Scanned with OKEN Scanner

minore ale schemei moleculare inițiale a lui Watson și Crick, confirmînd însă trăsăturile principale ale structurii dublu elicoidale. Prin studii de difracție cu raze X s-a arătat că ADN extras dintr-o mare diversitate de celule, aflate în stadii de activitate variate, se găsește în formă dublu spiralată. S-a dovedit că sub aceeași formă se găsește și ADN care poate fi accesibil analizei prin aceste metode în stare nativă sau mai apropiată de cea naturală, cum este cel din sperma intactă, din nucleoproteinele extrase din nucleele celulare sau cel din nucleele întregi izolate din timus sau din globulele roșii de pasăre. S-a arătat că polinucleotidele sintetice formează și ele duble spirale asemănătoare (analizate în paragraful următor).

Argumente suplimentare în favoarea schemei de împerechere a lui Watson și Crick au fost aduse de experiențele lui Kornberg asupra sintezei de ADN *in vitro*, pornind fie de la bazele obișnuite, fie de la baze substituite: 5-bromouracil, 5-bromcitozină, 5-metilcitozină etc. Se poate vedea din fig. 9.2 că substituirile în poziția 5 nu împiedică formarea legăturilor de hidrogen între perechile de baze, astfel încît, dacă punctul de vedere al lui Watson și Crick este corect, era de așteptat ca aceste baze substituite în poziția 5 să poată fi încorporate într-un dublu helix cu tot atîta ușurință ca și bazele normale nesubstituite. Este ceea ce s-a dovedit în fapt în cazul sintezei de ADN *in vitro*. *In vitro*, uracilul sau 5-bromouracilul pot fi încorporate în ADN în locul timinei (5-metiluracil), dar nu pot înlocui nici o altă bază. Citozinele substituite pot fi încorporate în locul citozinei, dar, la rîndul lor, nu pot înlocui nici una dintre celelalte baze.

Condițiile în care s-a realizat sinteza de ADN *in vitro* reprezintă ele însele o confirmare suplimentară a schemei lui Watson și Crick: în sistemul enzimatic al lui Kornberg, pentru a se putea sintetiza un nou ADN, trebuie să fie prezente toate cele patru nucleotide componente în formă de trifosfați, precum și o ADN-polimerază și anumiți cofactori, cum ar fi ionii de Mg^{++}. Dacă se adaugă în acest sistem o cantitate mică de ADN, aceasta acționează ca tipar sau inițiator („primer") pentru sinteza de ADN nou. În aceste condiții, noul ADN format are aceeași compoziție în baze ca și ADN folosit ca inițiator.

S-a stabilit deci cu destulă certitudine că ADN extras din majoritatea surselor, ADN sintetizat *in vitro* și marea majori-

tate a ADN din anumite celule se găsesc sub formă de spirală dublu catenară de tip Watson-Crick. Vom vedea totuşi în paragrafele următoare că ADN provenit din anumite surse se află în unele situaţii, în formă monocatenară, fiecare moleculă conţinînd numai un singur lanţ de acid nucleic.

DUBLE ŞI TRIPLE SPIRALE DE POLINUCLEOTIZI

În 1955, Grunberg-Manago şi Ochoa au izolat o enzimă care uneşte între ei nucleotizii difosforilaţi (cu eliminarea uneia dintre cele două grupări fosfatice), ducînd astfel la formarea de lanţuri de ARN *in vitro*. După cum am văzut, acizii nucleici naturali conţin patru tipuri diferite de baze în secvenţe diferite. Se pot obţine însă acizi nucleici sintetici alcătuiţi dintr-un singur tip de bază sau, dacă enzima a fost incubată cu un amestec de două sau mai multe baze, se vor obţine acizi nucleici conţinînd numai aceste baze, ce se succed la întîmplare în cadrul secvenţei respective. Acizii nucleici formaţi prin sinteză *in vitro* şi a căror compoziţie în baze este restrînsă au primit denumirea de *polinucleotizi*.

În apă distilată sau în prezenţa unor concentraţii saline foarte scăzute, majoritatea polinucleotizilor se găsesc sub formă de molecule monocatenare, ale căror lanţuri moleculare se află sub o formă flexibilă, încolăcită dezordonat. Pe măsură ce se măreşte concentraţia sărurilor din soluţie, se observă o tendinţă a acestor lanţuri de a se răsuci împreună formînd spirale. Într-o soluţie salină fiziologică, spre exemplu (adică o soluţie în care concentraţia sărurilor este echivalentă cu cea din citoplasma celulară), care conţine atît acid poliriboadenilic (poli-rA), alcătuit numai din ribonucleotizi adenilici, cît şi acid poliribouridilic (poli-rU), format numai din baze uracilice, polinucleotizii vor da naştere unor helixuri dublu catenare: prin studii de difracţie cu raze X s-a arătat că acestea sînt foarte asemănătoare cu cele ale ADN normal. Prezenţa structurii spiralate poate fi dovedită şi prin determinarea rotaţiei optice şi a absorbţiei radiaţiilor ultraviolete de către soluţia respectivă (interacţiunile dintre baze în cadrul dublelor spirale scad puterea lor de a absorbi radiaţiile ultraviolete). În absenţa Mg^{++}, se observă că agregarea produsă este maximă atunci cînd cele două tipuri de nucleotizi se găsesc în concentraţii egale, de unde concluzia că dublele

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

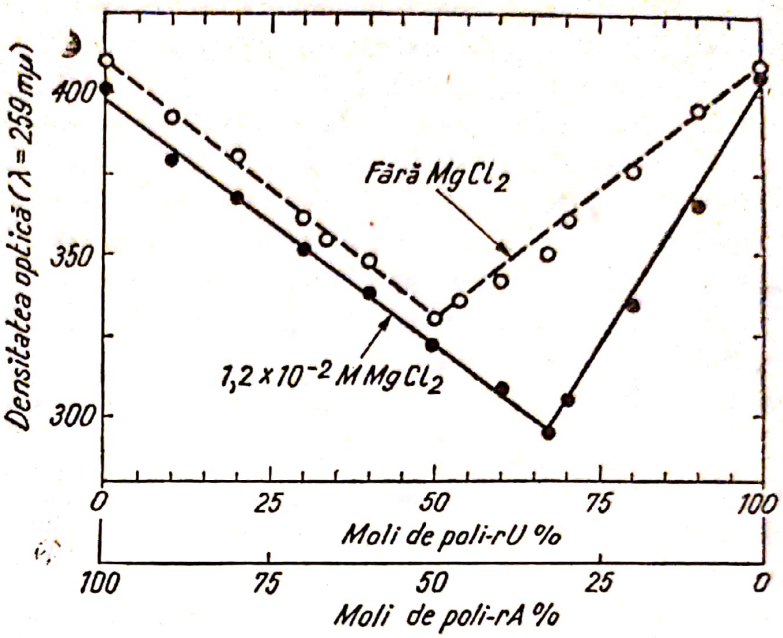


Fig. 9.4. Reprezentare grafică a absorbției radiațiilor ultraviolete (cu o lungime de undă de 259 mμ) în funcție de compoziția unor amestecuri de acid poliribouridilic (poli-rU) și poliriboadenilic (poli-rA) în absența ionilor de Mg^{++} și în prezența unei concentrații 1,2 × × 10^{-2} M de $MgCl_2$.

Vîrfurile de absorbție minimă indică complexarea care, în cele două cazuri, are loc la un raport de 1 :1 și, respectiv, de 1 :2 (după Felsenfeld și Rich, 1957).

spirale formate în aceste condiții conțin cîte un lanț de poli-rA și unul de poli-rU (fig. 9.4). Dacă la un amestec de poli-rA și poli-rU se adaugă Mg^{++} într-o concentrație de aproximativ $10^{-2}\mu$ se formează triple spirale, în care un lanț de poli-rA se răsucește împreună cu două lanțuri de poli-rU (fig. 9.4). Al doilea lanț de poli-rU se răsucește în spirală de-a lungul șanțului adînc al dublului helix de poli-rA—poli-rU. Bazele adoptă o asemenea poziție, încît să poată forma legături de hidrogen între ele; un mod posibil de aranjare a bazelor într-un triplu helix este redat în fig. 9.5.

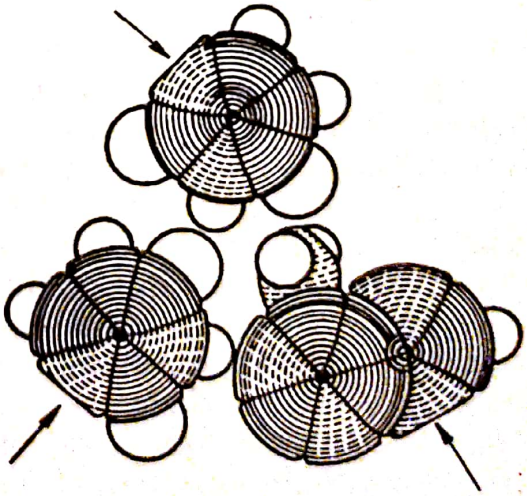


Fig. 9.5. Mod de dispunere propus de Zubay pentru formarea legăturilor de hidrogen între bazele dintr-un triplu helix de poli-rA —poli-rU—poli-rU.

Structura dublului helix format de un lanț de poli-rA și unul de poli-rU este asemănătoare cu cea a ADN (fig. 9.3). Între baze se formează legături de hidrogen ca în fig. 9.2. În helixul triplu, al doilea lanț de poli-rU se înfășoară în spirală de-a lungul șanțului adînc al structurii în dublu helix. Bazele celor două lanțuri inițiale trebuie să sufere o ușoară remaniere a orientării lor, pentru a forma legături de hidrogen cu uracilul suplimentar care se leagă acum cu fiecare pereche, dar încă nu este precizat dacă această remaniere are loc exact ca în modul ilustrat aici.

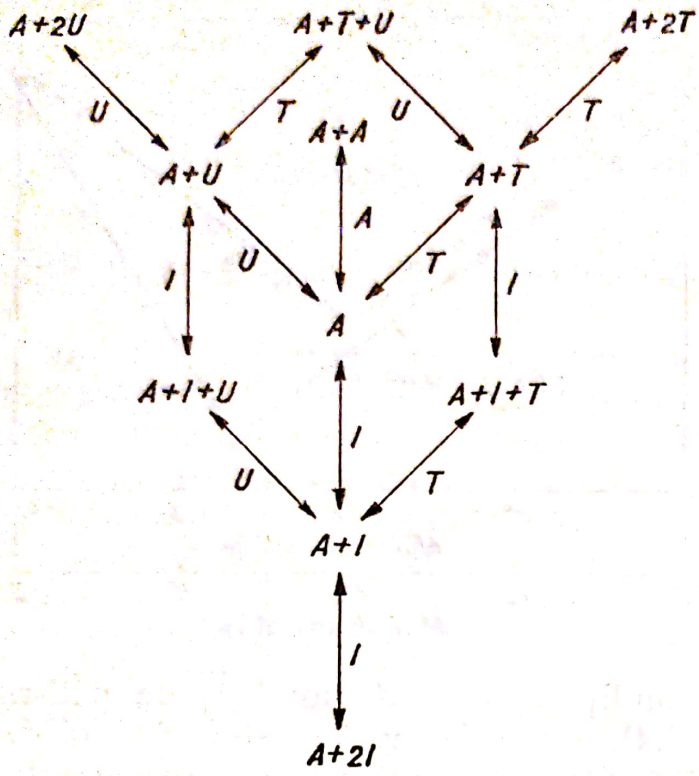


Fig. 9.6. Reprezentare schematică a diversității de duble și triple helixuri ce se formează între acidul poliriboadenilic și alți polinucleotizi în condiții adecvate de concentrație de Mg^{++} etc.:

A — acid poliriboadenilic.
U — acid poliribouridilic.
T — acid poliribotimidilic (un polinucleotid care conține numai baza timină ce se găsește în ADN natural, nu însă și în ARN natural).
I — acid poliriboinozinic (baza ce se repetă în structura acestui polinucleotid este hipoxantina, care este asemănătoare cu guanina, cu deosebirea că lipsește gruparea aminică din poziția 2).
Hipoxantina se poate împerechea cu citozina, deși în perechea guanină-citozină se formează numai două dintre legăturile de hidrogen ale perechii guanină-citozină. Alte duble și triple helixuri, nefigurate în această schemă, cuprind poli-rI-poli-rC, poli-rC-poli-rC-poli-rI-poli-rI și poli-rI-poli-rI-poli-rI (după Rich 1959).

Polinucleotizii sintetici pot forma o diversitate de duble și triple spirale (fig. 9.6). *In vitro* pot fi sintetizați atît polidezoxiribonucleotizi, cît și poliribonucleotizi, după cum pot lua naștere și duble spirale mixte, alcătuite dintr-un lanț ribonucleotidic și unul dezoxiribonucleotidic, atunci cînd între bazele celor două lanțuri se pot forma legături de hidrogen adecvate. S-a observat că, în afara perechilor Watson-Crick din fig. 9.2. sînt posibile și alte tipuri de împerecheri de baze (de exemplu, *A — A* în fig. 9.6), iar Donohue a arătat, cu ajutorul modelelor moleculare, că există cel puțin 29 de moduri în care bazele naturale se pot împerechea în combinații diferite sau cu formarea unor tipuri diverse de legături de hidrogen. Aceasta ridică problema dacă este adevărat că în dubla spirală de ADN nu există decît perechile din fig. 9.2. Dacă, pe baza argumentului furnizat de proporțiile bazelor, acceptăm că tipul Watson-Crick este cel predominant, va trebui să ne punem în primul rînd întrebarea ce anume face ca aceste perechi să fie atît de favorizate în comparație cu celelalte perechi care par posibile din punct de vedere teoretic. În al doilea rînd, se pune problema dacă în această structură pot fi încorporate

Scanned with OKEN Scanner

ocazional și alte perechi, cu o frecvență atît de mică însă, încît efectul lor să nu fie decelabil prin metodele actuale de determinare a proporțiilor de baze. Acest lucru are o importanță deosebită, întrucît, dacă secvența bazelor din ADN este într-adevăr purtătoarea informației genetice, stabilitatea eredității reclamă o replicare perfectă a secvenței ADN la fiecare generație. O mică greșeală în cursul copierii, datorată formării unei perechi normale de baze, va avea ca urmare o mutație (cap. 10). Este de un deosebit interes pentru noi determinarea frecvenței cu care se poate produce acest eveniment, pentru a putea aprecia astfel semnificația pentru evoluție a unei asemenea copieri greșite.

S-ar părea, la prima vedere, că în cazul unei structuri dublu spiralate perfect regulate, care conține atît purine, cît și pirimidine, o purină va trebui să se împerecheze totdeauna cu o pirimidină pentru a realiza distanța uniformă de 11 Å (1,1 mμ) între carbonii scheletului de care sînt legate bazele (vezi scara de dimensiuni din fig. 9.2). În cazul perechilor purină-purină, această distanță este, în general, ceva mai mare (13 Å), iar pentru perechile pirimidină-pirimidină, ceva mai mică (8,5 Å). Perechile Watson-Crick sînt de tip purină-pirimidină ; celelalte două perechi de același tip ar putea fi adenină-citozină și guanină-timină. Donohue a arătat că între bazele din aceste două perechi se pot stabili legături de hidrogen în mod satisfăcător și există unele dovezi că nucleotizii liberi în soluție se împerechează în acest mod ; dar în cadrul dublului helix de ADN restricțiile de orientare impuse de legarea pe inelele glucidice ale scheletului împiedică bazele să ajungă una față de cealaltă în poziția necesară pentru a se realiza acest fel de împerechere.

Ca atare, dacă în dublul helix de ADN nu se pot potrivi decît perechi purină-pirimidină și dacă formarea celorlalte două perechi de acest tip este împiedicată de însăși structura elicoidală, rezultă că nu poate avea loc decît formarea perechilor propuse de Watson și Crick. Cu toate acestea, Donohue a arătat că prin intermediul legăturilor de hidrogen se poate forma și o pereche adenină-guanină care să se potrivească bine în dubla spirală a lui Watson și Crick. În acest caz, este vorba de o pereche purină-purină în care bazele sînt orientate astfel, încît distanța dintre atomii de carbon ai scheletului de care sînt fixate

Scanned with OKEN Scanner

bazele respective este de aproximativ 11Å. Nu putem preciza încă cu ce frecvenţă se pot forma asemenea perechi de baze în ADN natural, dat fiind că la acest proces pot participa şi alţi factori; s-ar putea, spre exemplu, ca enzimele ce intervin în procesul de replicare a ADN să nu insere bazele noi decît într-o orientare specifică.

Studiul polinucleotizilor sintetici a început să ofere o bază pentru înţelegerea mai amănunţită a interacţiunilor dintre lanţurile de acizi nucleici în cadrul nucleului celular. Vom vedea în cap. 12 că sinteza moleculelor de ARN (ARN mesager), a cărui secvenţă de baze este determinată de ADN cromozomial, reprezintă o etapă importantă în cadrul controlului genetic al sintezei proteinelor. Uşurinţa cu care se formează triple spirale în prezenţa Mg^{++} sugerează că sinteza ARN ar putea avea loc de-a lungul şanţului adînc al dublului helix de ADN, secvenţa bazelor sale fiind determinată de cea a bazelor aflate în lanţurile de ADN. O altă posibilitate ar fi ca pentru controlul sintezei proteinelor ADN să funcţioneze într-o formă monocatenară, sinteza ARN cu o secvenţă de baze complementară celei a ADN avînd loc printr-un proces analog în esenţă cu cel implicat în sinteza unui lanţ nou de ADN (fig. 12.5).

FACTORI CE DETERMINĂ CONFIGURAŢIA ADOPTATĂ DE LANŢURILE DE ACIZI NUCLEICI

Am văzut în cap. 3 că structura axială a unui peptid nu este purtătoarea nici unei sarcini libere, cu toate că distribuţia electronică a sarcinilor pozitive şi negative pe grupările acestei structuri axiale joacă un rol important, determinînd lanţul peptidic să se înfăşoare în spirală. Alţi factori care fac ca lanţurile peptidice să adopte o configuraţie compactă sînt proporţia mare de catene laterale hidrocarbonice din proteine, precum şi atracţia electrostatică dintre grupările pozitive şi negative ale catenelor laterale.

Comparativ cu această situaţie, la $pH \sim 7$ acizii nucleici poartă cîte o sarcină negativă pentru fiecare grupare fosfatică din cadrul scheletului lor (notate în fig. 9.1 prin semnele minus, ce reprezintă fiecare cîte o jumătate de unitate de sarcină negativă de pe atomii de oxigen ai grupărilor fosfatice). Distribuţia internă

Scanned with OKEN Scanner

a electronilor în bazele nucleotizilor duce la concentrări locale ale unor încărcături negative şi pozitive pe grupările care formează legături de hidrogen: bazele nu au însă sarcini libere la pH ~ 7. Toate moleculele de acizi nucleici poartă astfel la pH ~ 7 o sarcină liberă negativă apreciabilă datorită grupărilor ce fac parte din scheletul lor. După cum am menţionat cu ocazia discuţiei despre peptidele sintetice şi despre denaturarea proteinelor în soluţii acide şi alcaline, existenţa unui număr important de sarcini libere într-o moleculă catenară lungă are ca urmare o atenuare a acelor forţe care tind să ducă la o înfăşurare compactă. În soluţii apoase, în prezenţa unor concentraţii saline foarte scăzute, acizii nucleici sînt monocatenari, lanţurile moleculelor lor fiind total flexibile, încolăcite la întîmplare şi schimbîndu-şi în permanenţă forma.

Prezenţa sărurilor în soluţiile apoase reduce efectul forţelor electrostatice. Regiunile cu sarcină negativă de pe o moleculă mare măresc, în imediata lor vecinătate, proporţia de ioni pozitivi faţă de cei negativi din soluţie. Aceasta are efectul unei perdele protectoare, reducînd forţele electrostatice ce se stabilesc între diferitele porţiuni ale unei asemenea molecule mari, precum şi forţele electrostatice dintre molecule. În cazul polinucleotizilor şi acizilor nucleici aflaţi în soluţii saline fiziologice, în special în prezenţa Mg^{++} sau a altor ioni bivalenţi, importanţa forţelor electrostatice ajunge să nu mai fie atît de hotărîtoare, intrînd în schimb în joc alţi factori. Suprafeţele inferioare ale nucleotizilor sînt plate sau discoidale, faţa superioară şi cea inferioară a acestor discuri fiind hidrofobă, în timp ce de-a lungul marginii lor se găsesc grupările N-H şi=O formatoare de legături de hidrogen. Într-un mediu apos, aceste baze au tendinţa să adere unele de altele eliminînd apa aflată în spaţiul dintre ele. (A se compara cu fenomenele similare de hidrofobie discutate în cap. 3 şi 6.) Acest efect este accentuat de forţele specifice de coeziune născute din interacţiunea electrică dintre moleculele aromatice aflate în rezonanţă.

În molecula de ADN, ca şi în dublele şi triplele spirale analizate în paragrafele precedente, două sau trei lanţuri se răsucesc împreună, aducînd astfel în contact suprafeţele bazelor lor. În împrejurări adecvate, aceste structuri sînt stabile, cu condiţia ca grupările formatoare de legături de hidrogen dispuse în jurul marginilor bazelor, şi care nu mai sînt în contact cu

Scanned with OKEN Scanner

apa, să fie capabile să formeze punţi de hidrogen satisfăcătoare în cadrul spiralelor. În acest caz, legăturile constituie un factor adiţional care stabilizează structura elicoidală; se apreciază că stabilitatea helixurilor poate fi atribuită în măsură aproximativ egală factorilor hidrofobi şi acţiunii legăturilor de hridrogen. În prezenţa unor concentraţii saline fiziologice, aceste forţe de atracţie dintre baze ajung să devină precumpănitoare faţă de cele de repulsie electrostatică dintre grupările fosfatice. (Dispunerea grupărilor fosfatice de jur împrejurul *periferiei* structurilor elicoidale duce la separarea acestor grupări între ele şi reduce forţele de repulsie atît cît o permite restul condiţiilor existente.)

În cazul acizilor nucleici, ca şi în cel al proteinelor, structurile secundare întîlnite în condiţii fiziologice sînt rezultatul unui discret dezechilibru între anumite forţe opuse, de intensitate aproape echivalentă, dintre care unele favorizează adoptarea de către aceste molecule catenare flexibile a formei desfăşurate, dezordonate şi celelalte, pe cea înfăşurată. Ca atare, aceste structuri secundare sînt deci foarte labile, permiţînd variaţii şi constituind baza rolului lor fiziologic subtil.

ARN ŞI ADN MONOCATENARI

Am discutat pînă acum două dintre tipurile structurale ale moleculelor de acizi nucleici: lanţurile încolăcite dezordonat, total flexibile şi cu o formă în continuă schimbare, întîlnite în prezenţa unor concentraţii saline scăzute, şi moleculele lungi, în formă de fir răsucit, relativ rigide, produse prin încolăcirea împreună a lanţurilor de acizi nucleici şi de polinucleotizi, care alcătuiesc astfel duble şi triple helixuri. Dar cu aceasta nu am epuizat încă acest subiect. Atunci cînd polinucleotid-fosforilaza descoperită de Grunberg-Manago şi Ochoa acţionează asupra unui amestec constituit în proporţii egale, din cei patru ribonucleotizi, se formează un lanţ de acid nucleic sintetic, poli-rAGUC, în care cele patru baze se găsesc în proporţii practic egale, dar se succed la întîmplare. Acest ARN sintetic se comportă altfel decît polinucleotizii simpli, ce cuprind un singur fel de baze. La concentraţii saline coborîte, lanţurile lui se găsesc sub formă monocatenară încolăcită dezordonat; cînd

Scanned with OKEN Scanner

însă concentrația sărurilor este crescută, lanțurile de poli-rAGUC nu prezintă de loc tendința de a se agrega în duble sau triple spirale. Moleculele rămîn monocatenare, începînd să se formeze însă în interiorul fiecărei molecule zone dublu spiralate, ca rezultat al legăturilor de hidrogen ce unesc între ele baze din porțiuni diferite ale lanțului.

Demonstrarea acestei răsuciri sub formă de zone dublu spiralate, precum și evaluarea întinderii acestora se pot efectua prin aprecierea modificărilor în absorbția radiațiilor din spectrul ultraviolet de către soluțiile de poli-rAGUC cu concentrație salină fiziologică, în urma încălzirii lor (fig. 9.7). Absorbția radiațiilor ultraviolete de către poli-rAGUC crește treptat o dată cu încălzirea, urmînd o curbă care tinde spre orizontală la 80-90 °C. Această creștere a absorbției este urmarea unei scăderi a interacțiunilor dintre baze pe măsura desfășurării porțiunilor răsucite ale moleculei. În condiții asemănătoare, ADN dublu spiralat prezintă o tranziție mai accentuată și mai

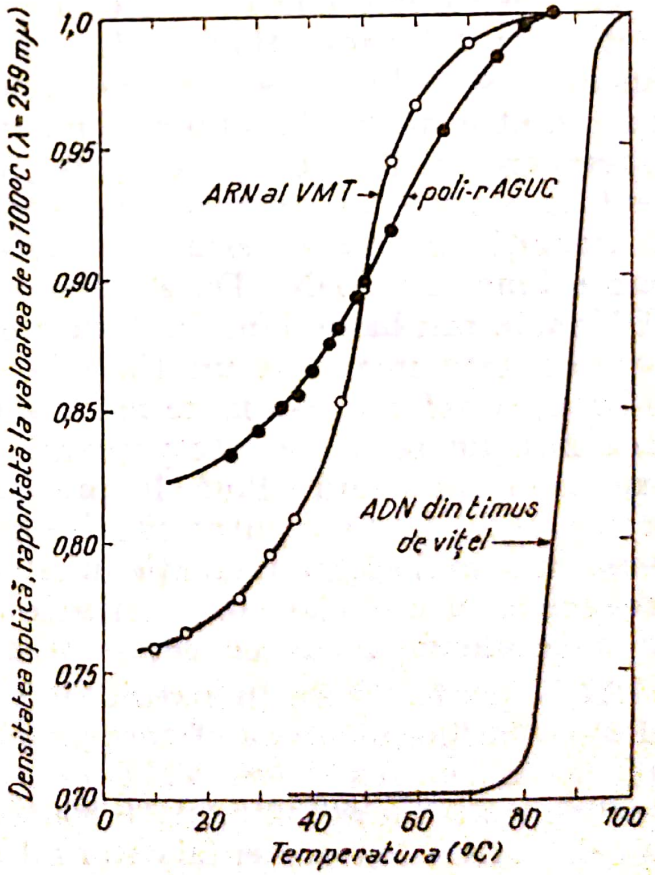


Fig. 9.7. Modificarea spectrului de absorbție a radiațiilor ultraviolete (la o lungime de undă de 259 mμ), produsă prin încălzirea soluțiilor de poli-rAGUC, de ARN al VMT și de ADN din timusul de vițel (după Doty și colab., 1959).

Scanned with OKEN Scanner

bruscă în jurul temperaturii de 80 °C (fig. 9.7). Dacă soluțiile sînt apoi răcite din nou, se constată că fenomenul este total reversibil în cazul poli-rAGUC, în timp ce la ADN reversia se obține numai dacă răcirea se produce lent sau dacă soluția respectivă este menținută un timp la 60-70 °C. Chiar și în aceste condiții însă, ADN provenit din numeroase surse prezintă numai un grad parțial de reversie; în cursul răcirii, curba ADN este mai degrabă asemănătoare cu cea a poli-rAGUC.

Explicația acestor efecte, confirmate și prin cercetări de rotație optică și de ultracentrifugare, constă în aceea că tranziția bruscă a ADN corespunde unei desrăsuciri complete a dublului helix și că la temperaturi peste 90 °C agitația termică este suficientă pentru a aduce toți acizii nucleici la forma monocatenară încolăcită la întîmplare, chiar și în prezența unor concentrații saline fiziologice. Comparînd amplitudinea modificării totale a absorbției între 20 și 90 °C pentru ADN și poli-rAGUC, se constată că în cazul poli-rAGUC, la 20 °C, aproximativ 60% din baze sînt cuprinse în zone dublu spiralate. Aceste zone duble elicoidale ale poli-rAGUC monocatenar sînt relativ scurte, prezentînd variații atît în ceea ce privește lungimea, cît și stabilitatea. Pe măsură ce poli-rAGUC este încălzit, unele dintre regiunile dublu spiralate încep să se „topească" la temperaturi încă destul de joase, de unde rezultă o creștere treptată a curbei absorbției radiațiilor ultraviolete, spre deosebire de tranziția bruscă ce este caracteristică topirii dublului helix foarte lung de ADN. Dacă se denaturează în acest mod un ADN fagic sau bacterian, după care el este lăsat să se răcească lent sau este menținut un timp la o temperatură în jur de 60-70 °C, se refac într-o mare măsură moleculele dublucatenare; dacă însă nu se iau aceste precauții, ADN se răcește păstrînd forma monocatenară. Pînă în prezent, ADN provenit din alte surse și încălzit nu a putut fi renaturat decît în parte. Aceasta constituie, probabil, o indicație în sensul că în materialul genetic provenit de la organismele superioare există un număr mai mare de molecule de ADN cu secvențe de baze deosebite.

ADN poate exista în natură sub formă monocatenară, iar ARN se întîlnește probabil totdeauna în această formă în condiții naturale. ARN din VMT este constituit dintr-un singur lanț alcătuit din aproximativ 6 500 de nucleotizi (cap. 4). Moleculele de ARN de transfer (al căror rol va fi discutat în cap. 12)

Scanned with OKEN Scanner

sînt lanţuri unice formate din 70-80 de nucleotizi şi se regăsesc în fracţiunea supernatantă a omogenatelor de celule. ARN extras din ribozomi şi din virusurile sferice mici, precum şi ADN din virusul ØX174 sînt, de asemenea, monocatenare.

Comportarea la încălzire a acestor acizi nucleici monocatenari este similară, în esenţă, cu cea a poli-rAGUC, cu toate că între acizii nucleici monocatenari proveniţi din surse diferite există variaţii din punctul de vedere al măsurii în care are loc formarea de legături de hidrogen la 20°C. ARN extras din VMT, spre exemplu (fig. 9.7), precum şi ARN de transfer au un conţinut spiralar mai mare decît poli-rAGUC. Aceasta reflectă, probabil, faptul că în lanţurile de ARN din VMT şi de ARN de transfer există segmente cu secvenţă complementară mai lungi sau mai numeroase decît cele pe care hazardul le face să apară în cadrul secvenţei întîmplătoare din poli-rAGUC.

Pe baza studiului interacţiunilor dintre polinucleotizi, Fresco, Alberts şi Doty au propus un model al tipului de structură pe care s-ar putea să-l adopte în condiţii fiziologice o moleculă de acid nucleic monocatenar avînd cca. 60% din bazele sale prinse în zone dublu spiralate. Ei au arătat că, pe măsură ce se formează structura secundară în cursul răcirii unui acid nucleic monocatenar, are loc o continuă desfacere şi refacere a porţiunilor unite prin legături de hidrogen, pînă ce se ajunge la o structură în care formarea legăturilor de hidrogen şi răsucirea în dublă spirală este maximă. Ei consideră că ceea ce permite ca o proporţie atît de mare din baze să fie unite prin acest tip de legături—chiar atunci cînd secvenţa de baze din diferite regiuni ale lanţului nu favorizează în mod deosebit împerecherea complementară — este faptul că acele porţiuni ale secvenţei de baze care nu se „potrivesc" pot fi proiectate în afara dublului helix sub formă de bucle (fig. 9.8). Formarea mai multor spirale scurte (ca în fig. 9.8) în locul unui singur helix asigură un grad mai mare de libertate, în sensul că permite includerea unui număr maxim de baze în zonele dublu elicoidale, concomitent cu formarea unui număr mai redus de bucle. Acolo unde proporţia de baze care la 20° sînt cuprinse în zonele dublu spiralate este mai mare de 60%, ca în cazul ARN extras din VMT sau al ARN de transfer, ne putem aştepta ca aceste zone dublu elicoidale să fie mai regulate, cu mai puţine bucle.

Scanned with OKEN Scanner

Argumentele enunțate într-un paragraf precedent și care pledează în favoarea faptului că în ADN există numai perechile de tip adenină-uracil și guanină-citozină, nu pot fi extrapolate fără rezerve asupra structurii secundare a acizilor nucleici monocatenari; este posibil ca în aceștia să existe porțiuni scurte de

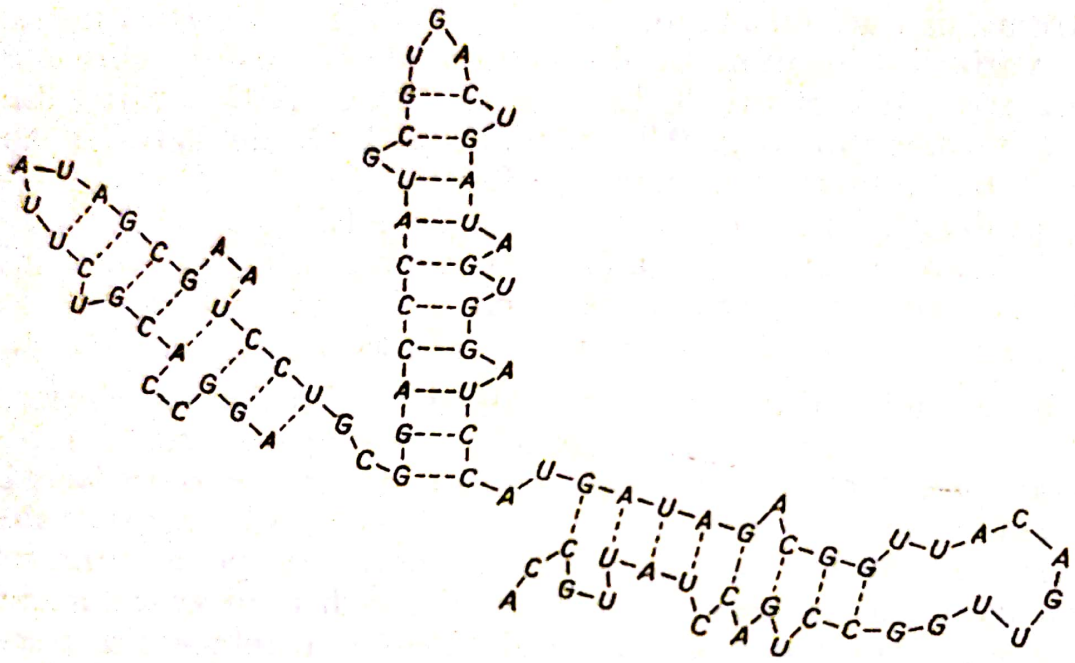


Fig. 9.8. Ilustrare schematică a structurii secundare a unei molecule monocatenare de acid nucleic.

În vederea elaborării acestei conformații, Fresco, Alberts și Doty au ales la întîmplare un lanț de 90 de nucleotizi în care cele 4 tipuri de baze se găseau în proporții relativ egale. Ei au încercat apoi să urce la maximum numărul de perechi de baze adenină-uracil și guanină-citozină, alcătuind regiuni duble helicale între care erau intercalate bucle și porțiuni scurte de baze neîmperecheate. Structura figurată aici este una dintre variantele posibile de aranjare în condițiile împerecherii a 50—70% din baze (după Fresco, Alberts și Doty, 1960).

helixuri purină-purină sau pirimidină-pirimidină, cînd secvența bazelor favorizează acest mod de dispunere. Se pare totuși că perechile adenină-uracil și guanină-citozină sînt deosebit de stabile, mai ales perechea guanină-citozină în care se poate forma o a treia legătură de hidrogen (fig. 9.2). Împerecherile guanină-citozină sînt probabil acelea care inițiază formarea unor porțiuni lungi de dublu helix purino-pirimidinic de tipul celui din ADN, ducînd la o preponderență marcată a acestui tip de structură secundară (ca în fig. 9.8) asupra altor tipuri de helix, cum ar fi le purino-purinic. Structura din fig. 9.8 a fost elaborată teoretic ca fiind cea mai probabilă dintre un mare număr de

Scanned with OKEN Scanner

configuraţii posibile ale secvenţei respective de nucleotizi. In această secvenţă, cele patru baze se găsesc în proporţii egale, dar într-o ordine aleasă la întîmplare.

Trebuie să se admită că în condiţii fiziologice zonele spiralate vor continua, în oarecare măsură, să se desfacă şi să se formeze din nou chiar atunci cînd sînt atinse condiţiile stabilirii unui maxim de legături de hidrogen, astfel încît, dacă secvenţa de baze permite şi alte configuraţii —ca aceea din fig. 9.8, în care proporţia de baze legate prin legături de hidrogen este de aproximativ 60%—molecula monocatenară va trece permanent de la o configuraţie la alta. Dacă secvenţa de baze nu permite decît o singură configuraţie în care să fie favorizată împerecherea bazelor, lanţul de acid nucleic va avea tendinţa de a forma o structură tridimensională stabilă, caracteristică pentru secvenţa sa de nucleotizi, tot aşa cum un lanţ polipeptidic formează, prin încolăcirea sa, o structură compactă, caracteristică secvenţei sale de aminoacizi.

Structura secundară a unui lanţ de acid nucleic monocatenar poate fi modificată în urma interacţiunii sale cu o proteină sau cu alţi acizi nucleici. Cînd ARN din VMT este încorporat în particula virală, structura secundară pe care o îmbracă ARN în stare izolată se pierde complet; configuraţia lanţului de acid nucleic în particula virală este determinată de componenta proteică a acesteia (cap. 4).

Structura dublu spiralată a lui Watson şi Crick explică regularitatea compoziţiei în baze a ADN provenit din majoritatea surselor, dar alte constante ale compoziţiei în baze ale acizilor nucleici (tabelul 9.2) rămîn neexplicate. De ce, spre exemplu, în ADN monocatenar al bacteriofagului ØX174 raportul $\frac{\text{purine}}{\text{pirimidine}}$ este apropiat de unitate? De ce, aşa cum au constatat Elson şi Chargaff, raportul $\frac{6-\text{amino}}{6-\text{ceto}}$ este adesea unitar în cazul ARN, în care raportul $\frac{\text{purine}}{\text{pirimidine}}$ diferă semnificativ de unitate? De ce în cazul ARN de transfer monocatenar din *E. coli* atît raportul $\frac{\text{purine}}{\text{pirimidine}}$, cît şi raportul $\frac{6-\text{amino}}{6-\text{ceto}}$ au valori apropiate de unitate?

ARN solubil a cărui compoziţie în baze este redată în tabelul 9.2 reprezintă un extract total, care cuprinde totalitatea diferitelor feluri de molecule de ARN de transfer, despre care se presupune că leagă fiecare în mod specific cîte unul dintre diversii aminoacizi (cap. 12), precum şi alte componente de ARN din fracţiunea supernatantă a omogenatelor de celule. Ca atare, regularităţile observate în compoziţia acestui material au un caracter statistic, nefiind în mod obligatoriu valabile în cazul fiecărei molecule de ARN de transfer în parte. Cu toate acestea, datele de rotaţie optică discutate mai sus arată că în ARN de transfer se întîlneşte o proporţie relativ mare de perechi de baze complementare. Structura ARN de transfer este analizată mai amănunţit în cap. 12.

Faptul că atît ADN, cît şi poliribonucleotizii şi polidezoxiribonucleotizii pot forma duble spirale, precum şi comportarea asemănătoare a ADN monocatenar şi a ARN monocatenar arată că prezenţa sau absenţa grupărilor —OH din poziţia 2′ a ribozei influenţează în mică măsură proprietăţile fizice ale celor două tipuri de acizi nucleici (deşi are efect asupra configuraţiei detaliate a dublelor sau triplelor spirale). Deosebirile marcate dintre proprietăţile ADN şi ale ARN extrase din celule şi virusuri (fig. 9.7) provin din aceea că ADN se găseşte de obicei în forma complementară dublu elicoidală, în timp ce ARN se află în formă monocatenară. Cele două tipuri de acizi nucleici sînt suficient de asemănătoare pentru a permite formarea de duble spirale alcătuite dintr-un lanţ de ADN şi unul de ARN; vom vedea în cap. 12 că formarea unor asemenea duble spirale poate servi pentru a demonstra că lanţurile a două preparate de acizi nucleici diferiţi au secvenţe complementare. Se pare că dublele spirale de ADN sînt ceva mai stabile decît cele mixte, ce conţin un lanţ de ADN şi unul de ARN. Aceasta ar putea să constituie un factor important de influenţare a interacţiunii dintre cele două tipuri de acizi nucleici în celule.

NUCLEOPROTAMINE ŞI NUCLEOHISTONE

În celulele spermatice, ca şi în nucleele celulelor somatice, cea mai mare parte din ADN este asociată structural cu protamine şi cu histone. Acestea sînt proteine care conţin o proporţie

Scanned with OKEN Scanner

neobișnuit de mare de catene laterale bazice — arginină și lizină — și în care o proporție mare din catenele laterale de acid glutamic și acid aspartic se găsesc sub formă amidică (tabelul 3.2). La pH ~ 7 ele vor fi deci purtătoarele unui mare număr de sarcini libere pozitive. Acizii nucleici fiind purtătorii unui mare număr de sarcini libere negative, rezultă că cele două componente ale nucleoprotaminelor și nucleohistonelor — proteina și acidul nuleic — vor fi solidarizate în mare măsură prin forțe electrostatice. Protaminele se deosebesc de histone printr-o mai mică varietate a compoziției în aminoacizi (tabelul 3.2) și constituie principala componentă proteică din sperma anumitor specii : salmina din sperma de somon, clupeina din cea de scrumbie etc. În nucleele tuturor celulelor somatice, inclusiv ale celor de somon și scrumbie, precum și în sperma altor specii, principala componentă proteică a dezoxiribonucleoproteinelor este reprezentată de histone.

Studii de difracție cu raze X au arătat că în nucleoprotamine, atît în cele din extracte, cît și în cele din sperma nativă, ADN se găsește sub formă de dublu helix. Una dintre structurile propuse pentru nucleoprotamine este reprezentată în fig. 9.9. În cadrul acestei structuri, lanțul peptidic al protaminei se înfășoară în jurul dublului helix fiind așezat în așa fel în șanțul mic al acestuia, încît grupările bazice, cu sarcină pozitivă, ale catenelor laterale se găsesc în imediata vecinătate a grupărilor fosfatice, cu sarcină negativă, ale dublei spirale. În clupeină s-a constatat o așezare a catenelor laterale nebazice în perechi ce alternează, de-a lungul lanțului polipeptidic, cu secvențe tetrapeptidice de arginină ; în structura reprezentată în fig. 9.9, perechile nebazice sînt figurate sub forma unor pliuri situate între fiecare dintre secvențele tetrapeptidice de arginină.

Tot sub formă de dublu helix pare să se găsească și ADN din extractele de nucleohistone, precum și cel din nucleele izolate din timusul de vițel și din globulele roșii de pasăre. Structura și poziția histonelor din cadrul nucleohistonelor nu au fost însă atît de bine stabilite ca în cazul protaminelor din cadrul nucleoprotaminelor. Se pare că o anumită proporție a lanțurilor peptidice de histonă se poate găsi sub formă de α-helix și nu sub forma, mai desfășurată, a lanțului peptidic din nucleoprotamine, tot așa cum este posibil, dar nu cert, ca histonele să fie dispuse în șanțurile dublei spirale de ADN.

Scanned with OKEN Scanner

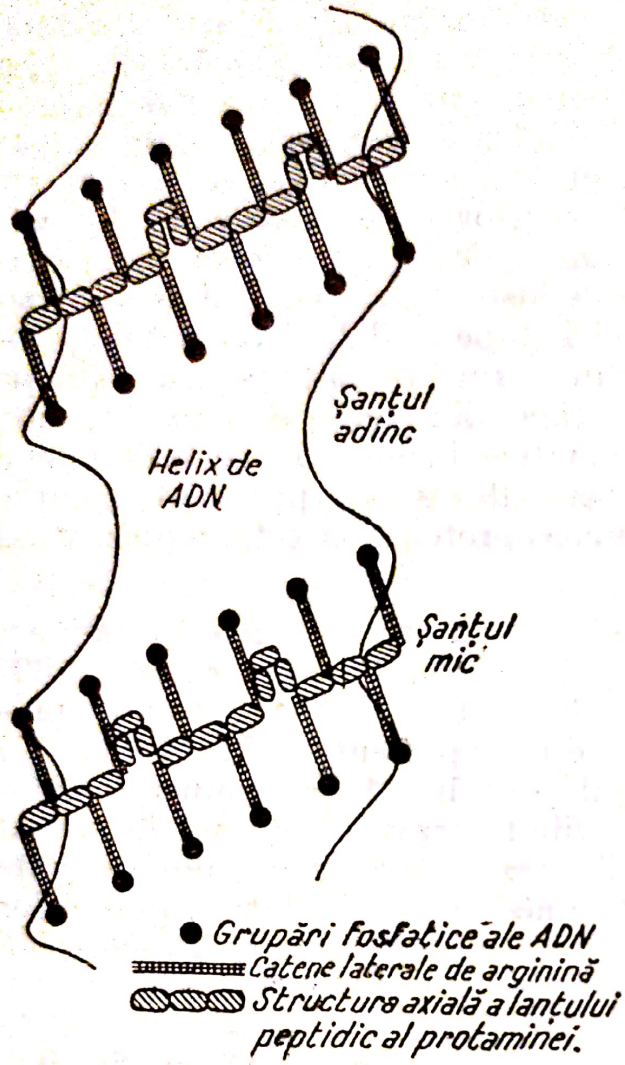


Fig. 9.9. Structură a nucleoprotaminelor, propusă pe baza studiilor de difracție cu raze X și de determinare a secvențelor de protamină.

Modelul presupune că lanțul peptidic de protamină este așezat în șanțul mic din lungul dublului helix de ADN, capetele libere bazice, încărcate pozitiv, ale catenelor laterale de arginină fiind menținute în această poziție prin atracția electrostatică de către grupările fosfatice ale ADN, încărcate negativ. Catenele laterale nebazice ar fi dispuse în perechi, formînd o plică ce proeminează din șanțul mic (așa încît numai grupările bazice se potrivesc bine în acest șanț). Fiecare grupare fosfatică leagă cîte o catenă laterală încărcată pozitiv. (Secvențele mai lungi de catene laterale nebazice și-ar putea găsi loc în această structură sub forma unor bucle mai largi; această structură nu presupune în mod necesar ca lanțurile laterale bazice să se găsească sub formă de grupări tetrapeptidice) (după Wilkins, 1956).

În ceea ce privește rolul protaminelor și al histonelor, deși pe baza datelor trecute în revistă în cap. 8 pare foarte probabil astăzi ca informația genetică purtată de spermatozoid să fie înscrisă în special în secvența nucleotizilor din ADN, nu se poate exclude complet posibilitatea ca o parte din informație să fie încorporată în componenta protaminică sau histonică. Unul dintre rolurile jucate de aceste proteine în spermatozoizi — și poate singurul lor rol — este acela de a neutraliza sarcinile libere ale moleculelor de ADN, ușurînd astfel înfășurarea lor compactă în interiorul capului spermatozoidului. În celulele somatice s-ar putea ca histonele să participe la replicarea ADN sau la transferul de informație de la ADN la sistemul de sinteză a proteine-

Scanned with OKEN Scanner

lor, tot așa cum s-ar putea ca ele să aibă un rol structural pur, constituind punțile care leagă între ele moleculele de ADN în cadrul structurii cromozomului. Există unele dovezi în sensul că histonele ar forma punți de acest tip între moleculele de ADN aflate în preparatele de nucleohistone extrase din nuclee.

Trebuie reamintit că diametrul unei duble spirale de ADN este de aproximativ 2 mμ, în timp ce filamentele cromozomiale cele mai fine vizibile la microscopul optic au un diametru de 100—200 mμ. Ca atare, aceste filamente trebuie să conțină fie un mare număr de duble spirale de ADN organizate sub forma unei structuri nucleoproteice complexe, fie un singur dublu helix lung de ADN, răsucit în mod complex. Pe microelectronografii ale anumitor celule se pot observa filamente cromozomiale subțiri, cu un diametru intermediar între cel al dublei spirale de ADN și cel al filamentelor vizibile la microscopul obișnuit. Filamentele constitutive ale cromozomilor cu formă de perie de spălat sticle din oocitele de amfibii, spre exemplu, au un diametru de aproximativ 20 mμ. Or, chiar și aceste filamente sînt de un ordin de mărime superior celui al dublelor spirale de ADN; modul în care sînt reunite, răsucite sau înfășurate dublele helixuri de ADN în cadrul unor asemenea filamente nu se cunoaște încă.

Mai există și posibilitatea ca histonele să nu participe direct nici în replicarea ADN, nici în sinteza proteinelor, ci să îndeplinească un rol negativ în cursul diferențierii, realizînd inactivarea unei părți a materialului genetic. Majoritatea celulelor somatice conțin garnitura genetică integrală a întregului organism, și este de presupus că ADN aflat în ele conține toată informația necesară pentru sinteza tuturor proteinelor necesare organismului în toate stadiile de dezvoltare și de diferențiere. În oricare celulă și în fiecare moment, o mare parte din potențialul aparatului de sinteză a proteinelor trebuie să fie relativ inactiv. S-ar putea ca histonele, sintetizate într-un stadiu anumit al diferențierii celulei, să fie legate într-un mod specific de anumite regiuni ale materialului genetic, umplînd, spre exemplu, șanțurile dublei spirale de ADN și făcînd-o să devină inactivă din punctul de vedere al sintezei de ARN. Această ipoteză este susținută în parte de rezultatele experiențelor lui Allfrey și Mirsky. Prin tratarea cu tripsină a unor nuclee izolate din celulele de timus, ei au îndepărtat o parte din histonele acestora și ca urmare au constatat o creștere marcată a sintezei de ARN mesager.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 9.3 Date asupra ribozomilor și acizilor nucleici

	Coeficient de sedimentare	Greutate moleculară	Diametru (mμ)		% și tip acid nucleic	Greutate moleculară a acidului nucleic	Număr de subunități proteice	Greutatea moleculară a subunităților proteice	Procent de acid nucleic în formă elicoidală
			Hidratat	Uscat					
Ribozomi de ficat de vițel (1,11,18)	80 S	$3,7 \times 10^6$	—	—	50% (ARN)	$1,9 \times 10^6$	60 până la 80	25 000	~70%
Ribozomi de reticulocit de iepure (2,3)	80 S	$4,0 \times 10^6$	34	20	40% (ARN)	$1,6 \times 10^6$	—	—	—
Ribozomi din răsaduri de mazăre (4,5)	80 S	$4,2 \times 10^6$	—	—	40% (ARN)	$1,7 \times 10^6$	—	—	—
Ribozomi de *E. coli* (6,7,8,9)	70 S	$2,8 \times 10^6$	—	16	63% (ARN)	$1,8 \times 10^6$	—	—	~75%
Virusul mozaicului galben al napului (VMGN) (7, 10, 12, 13)	—	$5,0 \times 10^6$	28	23	37% (ARN)	$1,8 \times 10^6$	180* / 150**	17 000 / 21 000	~50%
Virusul pipernicirii tomatelor (14, 17)	—	$8,9 \times 10^6$	31	27	17% (ARN)	$1,5 \times 10^6$	120	60 000	—
Virusul poliomielitei (15)	—	$6,7 \times 10^6$	30	—	30% (ARN)	$2,0 \times 10^6$	—	—	—
Virusul ØX174 (16, 17, 19)	—	$6,2 \times 10^6$	—	25	25% (ADN monocatenar)	$1,6 \times 10^6$	60	70 000	—

* Studii de difracție cu raze X (10)
** Cercetări chimice (13)

Scanned with OKEN Scanner

Ribozomii sînt particule ribonucleoproteice ce se găsesc într-o mare diversitate de celule. Ei se află în special în citoplasmă, cu toate că particule asemănătoare se găsesc şi în nucleele celulare. Legătura dintre ribozomi şi reticulul endoplasmic a fost discutată în cap. 5. După toate aparenţele, ei reprezintă în celulă sediile în care are loc asamblarea aminoacizilor în secvenţe specifice în cursul sintezei proteice (cap. 12). Faţă de interesul deosebit pe care îl stîrneşte în momentul de faţă cunoaşterea acestui proces, este aproape chinuitor şi exasperant faptul că ribozomii sînt foarte greu de obţinut în stare cristalizată şi de aceea nu pot fi încă studiaţi în amănunt prin tehnica difracţiei cu raze X. Ca atare, se cunosc foarte puţine lucruri despre structura ribozomilor, ceea ce face ca în acest paragraf să ne rezumăm mai ales la compararea unora dintre proprietăţile lor cu acelea ale virusurilor sferice mici, care au dimensiuni şi o compoziţie chimică asemănătoare.

Din punct de vedere chimic, ribozomii pot fi definiţi cu precizie ca fiind ribonucleoproteine; definirea lor în termenii mărimii particulelor şi ai greutăţilor lor moleculare este însă mult mai dificilă, deoarece mărimea particulelor dintr-un preparat purificat depinde de concentraţia Mg^{++}. Dacă în timpul extracţiei concentraţia Mg^{++} este menţinută la nivelul de 0,1 M, după

Indicaţii bibliografice pentru tabelul 9.3

[1] Hall, B. D. şi Doty, P., "J. mol. Biol.", *1*, 111, 1959.
[2] Dibble, W. E. şi Dintzis, H. M., "Biochim. biophys. Acta", *37*, 152, 1960.
[3] Rabinovitz, M. şi Olson. M. E., "Nature", *181*, 1665, London, 1958.
[4] T'so, P. O. P., Bonner, J. şi Vinograd, J., "Biochim. biophys. Acta", *30*, 570, 1958.
[5] T'so, P. O. P., în *Microsomal Particles and Protein Synthesis*, sub red. R.B. Roberts, Pergamon, London, 1958.
[6] Tissieres, A., Watson, J. D., Schlessinger, D. şi Hollingworth, B. R., "J. mol. Biol.", *1*, 221, 1959.
[7] Zubay, G. şi Wilkins, M. H. F., "J. mol. Biol.", *2*, 105, 1960.
[8] Kurland, C. G., „J. mol. Biol.", *2*, 83, 1960.
[9] Huxley, H. E. şi Zubay, G., "J. Mol. Biol.", *2*, 10, 1960.
[10] Klug, A. şi Finch, J. T., "J. mol. Biol.", *2*, 201, 1960.
[11] Doty, P., "Biochem. Soc. Symposia", *21*, 8, 1962.
[12] Huxley, H. E. şi Zubay, G., "J. mol. Biol.", *2*, 189, 1960.
[13] Harris, J. I. şi Hindley, J., "J. mol. Biol. ", *3*, 117, 1961.
[14] Caspar, D. L. D., "Nature", *177*, 475, London, 1956.
[15] Finch, J. T. şi Klug, A., "Nature", *183*, 1709, London, 1959.
[16] Sinsheimer, R. L., "J. mol. Biol.", *1*, 37, 1959.
[17] Klug, A. şi Caspar, D. L. D., "Ad. Virus Research", *7*, 225, 1960.
[18] Curry, J. B. şi Hersh, R. T., "Biochem, biophys. Res. Comm", *6*, 415, 1961.
[19] Carusi, E. A. şi Sinheimer, R. L., "Fed. Proc.", *20*, 438, 1961.

Scanned with OKEN Scanner

care este redusă, în preparatul final de ribozomi, la 10^{-3} M, se constată că tipul de particule care predomină în preparatele obținute din ficat de vițel, reticulocite de iepure, răsaduri de mazăre, precum și din alte surse animale sau vegetale are un coeficient de sedimentare de aproximativ 80 S, ceea ce corespunde unei greutăți moleculare de cca. 4.10^6 (tabelul 9.3). În preparatele de origine bacteriană (*E. coli*), particulele obținute prin acest procedeu sînt ceva mai mici (70 S, greutate moleculară $2{,}8.10^6$, tabelul 9.3). (Coeficientul de sedimentare este corelat cu greutatea moleculară, un coeficient de sedimentare ridicat indicînd o greutate moleculară mai mare, dar viteza de sedimentare este totodată influențată de formă și de gradul de hidratare).

Dacă în aceste preparate se mărește concentrația Mg^{++}, se observă tendința acestor particule de a se agrega sub formă de perechi. Dacă, dimpotrivă, se reduce concentrația Mg^{++}, particulele se scindează cu ușurință în subunități avînd, respectiv, 2/3 și 1/3 din greutatea moleculară a particulei originale. Ambele unități componente prezintă același raport cantitativ între proteină și acidul nucleic ca și cel din particula 80 S sau 70 S din care au provenit ; de aici rezultă că atît componenta proteică, cît și cea de acid nucleic trebuie să se scindeze în raport de 2/3 : : 1/3. Pe imaginile electronoptice ale ribozomilor de *E. coli* se observă că particulele 70 S sînt alcătuite dintr-o subunitate mai mare și una mai mică. În preparatele provenite dintr-o soluție cu concentrație mare de ioni de Mg^{++} se observă dimeri, ce par a fi luat naștere prin aderarea laolaltă a două particule 70 S prin intermediul ariei centrale a subunității mici (fig. 9.10).

Cu toate că particulele existente în preparatele cu o concentrație a Mg^{++} de 10^{-3} M sînt reprezentate în special de ribozomii 70 S sau 80 S, se întîlnește și o oarecare proporție de dimeri avînd dimensiuni mai mari, ca și de subunități 2/3 și 1/3. Modificarea concentrației Mg^{++} duce doar la schimbarea proporției diferitelor particule ribozomale existente. Este probabil că toate aceste tipuri, precum și alte componente ribonucleoproteice mai mici, se găsesc în celula vie într-un echilibru dinamic. În cazul *E. coli*, acest echilibru poate fi exprimat astfel :

dimer (100 S) $\rightleftharpoons$ doi ribozomi 70 S

ribozom 70 S $\rightleftharpoons$ 50 S (subunitate 2/3) + 30 S (subunitate 1/3) $\rightleftharpoons$ molecule ribonucleoproteice mai mici.

În anumite experienţe cu izotopi efectuate cu *E. coli* şi cu reticulocite a fost posibilă identificarea ribozomilor ce sînt angajaţi în mod activ la sinteza proteinelor (ribozomi „activi"). Se pare că particulele active din punct de vedere funcţional sînt

Fig. 9.10. Un amestec de ribozomi 70 S şi 100 S de *E. coli* evidenţiaţi la microscopul electronic prin tehnica contrastului negativ (a se compara cu imaginile virusurilor din cap. 4).

Se observă că ribozomii 70 S sînt alcătuiţi dintr-o subunitate mare (2/3) şi una mică (1/3). Ribozomii 100 S sînt formaţi din doi ribozomi 70 S ce vin în contact prin centrul subunităţii mici (1/3), formînd un agregat liniar de tipul mare-mic—mic-mare (după Huxley şi Zubay, 1960).

ribozomii 70 S şi 80 S. În cursul sintezei proteinelor, aceste particule formează complexe cu lanţul de ARN mesager (cap. 12). Aceste lanţuri au greutăţi moleculare între 150 000 şi $2{,}4 \times 10^6$, corespunzătoare unor lanţuri formate din 500 pînă la 8 000 de nucleotizi.

Pe microelectronografii, ribozomii activi izolaţi din reticulocite apar adunaţi în grupuri denumite *polizomi*, fiecare asemenea grupare conţinînd circa cinci particule 80 S. Uneori se poate observa cum particulele dintr-un asemenea grup sînt legate între ele printr-un filament subţire. Se presupune că acesta ar putea fi un lanţ de ARN mesager şi că în cursul sintezei proteinei ribozomii 80 S se deplasează de-a lungul acestui lanţ. Se

Scanned with OKEN Scanner

pare că de-a lungul unuia și aceluiași lanț de ARN mesager se pot deplasa concomitent mai mulți ribozomi (cap. 12).

În tabelul 9.3 sînt redate raporturile dintre proteină și acidul nucleic, precum și dimensiunile ribozomilor, comparativ cu datele corespunzătoare privitoare la virusurile sferice mici. Cantitatea de acid nucleic existent în ribozomii 80 S și 70 S, precum și în virusurile mici este surprinzător de constantă, de cca. 2×10^6 (aproximativ 6 000 de nucleotizi). Cantitatea de proteină variază în limite mai largi. Asemănarea de compoziție și mărime dintre aceste două tipuri de particule sugerează că ar putea exista și asemănări de structură între ele, dar anumite caractere pun în evidență existența unor deosebiri importante. Virusurile mici, spre exemplu, pot fi obținute cu ușurință în stare cristalizată, iar în unele cazuri acidul lor nucleic poate fi extras fără dificultate, păstrîndu-se învelișurile proteice stabile a căror structură a fost analizată în cap. 4. Ribozomii nu au putut fi cristalizați pînă în momentul de față și au tendința să se separe într-un mod cu totul diferit, în cele două subunități nucleoproteice 2/3 și 1/3, iar nu în proteină și acid nucleic. Se poate presupune deci că în ribozomi legătura dintre proteină și acidul nucleic este mai intimă decît la virusuri. Mai există și alte deosebiri între virusuri și ribozomii 80 S și 70 S : — virusurile prezintă o simetrie icosaedrală (cap. 4), în timp ce ribozomii au o structură asimetrică, evidențiată în primul rînd prin scindarea lor în subunități 2/3 și 1/3 și în al doilea rînd prin modul în care se unesc pentru a forma dimeri, în care vin întotdeauna în contact numai prin zona centrală a subunităților 1/3 (fig. 9.10) și niciodată prin vreo altă porțiune a suprafeței lor. Structura ribozomilor pare, de asemenea, să prezinte un grad mai accentuat de hidratare decît cea a virusurilor (a se compara dimensiunile în stare umedă și în stare uscată din tabelul 9.3).

ARN din subunitatea 1/3 a ribozomilor din ficatul de vițel și din *E. coli* pare a fi reprezentat de un singur lanț molecular (alcătuit din 1 500 pînă la 2 000 de nucleotizi). ARN din subunitatea 2/3 pare să conțină în mod obișnuit două lanțuri, fiecare avînd aceeași mărime cu cea a lanțului din subunitatea 1/3, deși în subunitățile 2/3 ale unora dintre ribozomii din *E. coli* ARN pare să fie reprezentat de un singur lanț de lungime dublă. La ARN încorporat în structura ribozomilor, gradul de interconectare a bazelor prin legături de hidrogen și cel de formare de helixuri, apreciate pe baza determinărilor de absorbție a radiațiilor din

Scanned with OKEN Scanner

spectrul ultraviolet şi de rotaţie optică, sînt asemănătoare cu acela al extractelor de ARN monocatenar (60—90%). Proporţia zonelor spiralate a fost evaluată la valori similare în cazul ARN din VMGN şi din alte virusuri sferice (virusul pipernicirii tomatelor, virusul mozaicului fasolei meridionale).

Se crede că ARN din VMGN şi ADN din bacteriofagul ØX174 se găsesc sub formă monocatenară (lanţuri alcătuite din aproximativ 6 000 de nucleotizi), încolăciţi probabil într-o structură secundară asemănătoare celei a acizilor nucleici monocatenari din extracte (fig. 9.8) şi acoperiţi de un înveliş alcătuit din subunităţi de proteină. (În cazul bacteriofagului ØX174 se pare că cele două capete ale lanţului de ADN sînt unite, formînd un inel.) După cum am arătat, în ribozomii 70 S şi 80 S cantitatea totală de ARN şi proporţia de structuri elicoidale cuprinse în cadrul structurii lui secundare sînt asemănătoare, dar se pare că în acest caz ARN este alcătuit din trei lanţuri formate fiecare din cca. 2 000 de nucleotizi (sau, în unii ribozomi de la *E. coli*, un lanţ avînd lungimea amintită şi un altul, o lungime dublă). De asemenea, în ribozomi interacţiunea dintre proteină şi acidul nucleic este mai strînsă. Cu toate acestea, continuăm să nu avem cunoştinţe nici asupra detaliilor de structură a ribozomilor, nici asupra modului în care are loc legarea de aceştia a ARN mesager în vederea dirijării asamblării aminoacizilor în cursul sintezei proteinelor (fig. 12.5). În momentul de faţă, acesta este unul dintre cele mai dezbătute subiecte din biologia moleculară, constituind un domeniu de experimentare febrilă.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 10

GENA

Cînd am descris, în cap. 7, diviziunea meiotică a celulelor și, în cap. 8, reprimarea informației ereditare, am considerat util să admitem că existența genelor este o realitate, că ele sînt înșirate liniar de-a lungul cromozomului și că gena poate fi definită, fără îndoială, ca unitate a eredității. Vom trece acum la examinarea mai amănunțită a acestor noțiuni. Procedînd în acest mod, vom avea de parcurs o cale care merge paralel cu analiza citologică de care ne-am ocupat înainte. Acest drum a fost croit prin perfecționarea continuă a fineței tehnicii fundamentale folosite de geneticieni, și anume analiza modului în care se distribuie caracterele părinților la descendenții obținuți prin încrucișări controlate. În ultimul timp, s-a putut consemna convergența finală a abordărilor citologice, chimice și genetice și a apărut posibilitatea, imprevizibilă în trecut, de a diseca în amănunt structura fină a materialului genetic.

NATURA PARTICULATĂ A EREDITĂȚII

În accepția ei cea mai elementară, teoria genei nu cuprinde decît următoarele două afirmații simple: 1) că este necesar să se facă o deosebire între complexul de trăsături vizibile care definesc un individ, cunoscute sub denumirea de *fenotip* al acestuia, și amestecul de factori moșteniți ce determină aceste trăsături și care constituie *genotipul* său; 2) că ereditatea este de natură *particulată* și nu se realizează prin contopire, cu alte cuvinte că factorii transmiși de părinți se combină la descendenți nu în modul în care vopseaua neagră se combină cu cea albă pentru

Scanned with OKEN Scanner

a rezulta culoarea cenuşie, ci mai curînd într-un mod asemănător felului în care se realizează un mozaic prin îmbinarea de pietricele albe şi negre, care nu se contaminează reciproc şi care, în principiu, pot fi separate apoi din nou în categoriile constituente de negru şi alb.

Teoria contopirii circula încă în vremea lui Darwin. Darwin însuşi o accepta parţial, deşi a atras atenţia asupra unor fapte de observaţie comună care veneau în contradicţie cu ea. Astfel, el a fost izbit de „reînvierea" unor caractere, adică de apariţia bruscă a unor asemănări frapante cu unul din apartenenţii generaţiei bunicilor sau unor strămoşi mai vechi, asemănări care însă nu se manifestaseră în mod vizibil la părinţi. Asemenea fenomene sînt mai uşor de interpretat în lumina teoriei pietricelelor de mozaic decît în aceea a culorilor şi sugerează că unităţile ereditare pot fi transmise în stare latentă, fără a-şi pierde identitatea sau potenţialul. Împotriva eredităţii concepute ca o contopire pledează şi faptul binecunoscut că o pereche de fraţi sau surori, deşi provin amîndoi din aceiaşi părinţi, nu vor prezenta suprapunerea perfectă de trăsături care se observă la gemenii identici (univitelini).

O dovadă dintre cele mai convingătoare a existenţei unităţilor sau particulelor ereditare şi a faptului că ele pot supravieţui indefinit unor amestecuri succesive poate fi obţinută dacă se încearcă, cu ajutorul metodei retroîncrucişărilor repetate, eliminarea prin „diluţie" a unui caracter transmis ereditar. Vom lua ca exemplu împerecherile dintre bovide, unde metoda a fost întrebuinţată în scopuri practice. Ocazional, printre vitele unei crescătorii apar indivizi care nu au coarne. Acest caracter „fără coarne" este preţuit de fermieri, deoarece animalele care îl prezintă au, în cirezile mari din fermele moderne, o comportare mai docilă decît animalele cu coarne. Dacă se procedează la o încrucişare între un taur din varietatea fără coarne şi o vacă cu coarne, descendenţii din prima generaţie vor fi lipsiţi de coarne. De aceea, acest caracter este denumit „dominant". Dacă descendenţii fără coarne proveniţi din împerecherea iniţială sînt împerecheaţi cu indivizi din rasa originală cu coarne (retroîncrucişare), apar două tipuri de descendenţi : unii au coarne, iar alţii nu, deşi trei sferturi din ascendenţii vitelor fără coarne din această generaţie sînt animale din rasa cu coarne. Această metodă, ilustrată în fig. 10.1, reprezintă o cale prin care fermierul poate impune caracterul „fără coarne" unei rase cu coarne,

Scanned with OKEN Scanner

păstrînd în acelaşi timp toate celelalte caractere avantajoase ale acesteia din urmă, cum ar fi cantitatea de lapte produsă etc. În mod practic, se alege un taur fără coarne care aparţine unei generaţii obţinute prin retroîncrucişare; se efectuează o a doua retroîncrucişare cu o vacă cu coarne, se selectează descendenţii

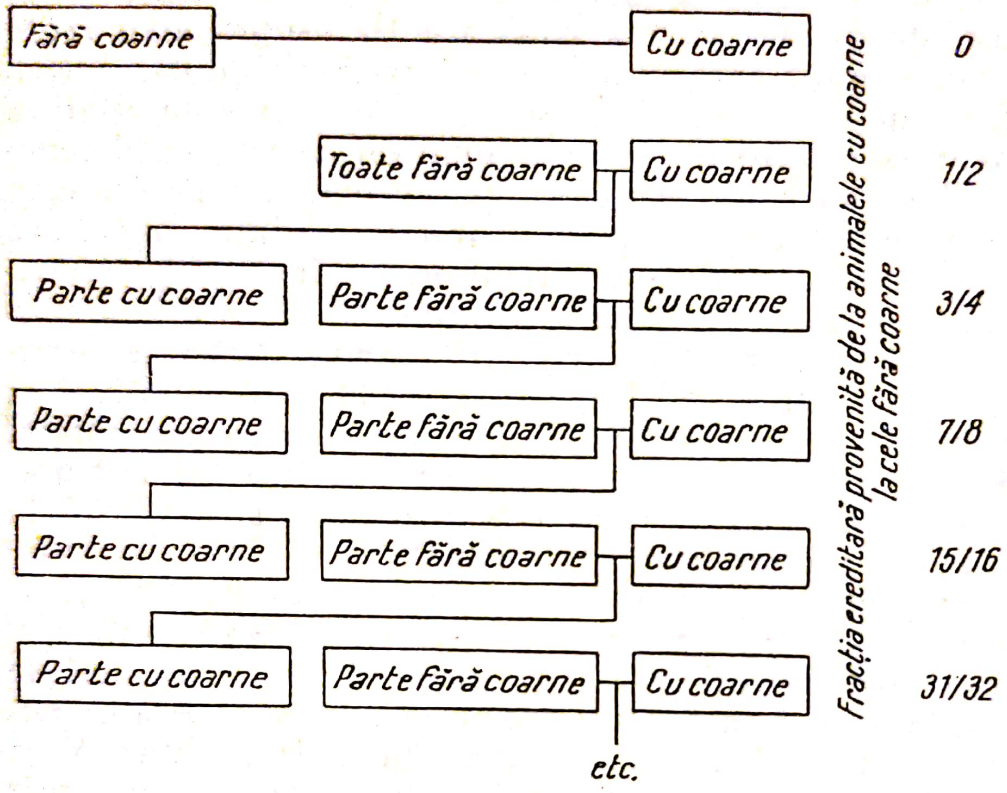


Fig. 10.1. Planul unei experienţe de retroîncrucişări repetate la bovide.
Oricît de mult s-ar repeta încrucişările, caracterul „fără coarne" nu poate fi eliminat prin diluare.

şi procedeul poate fi repetat ori de cîte ori voim. Examinarea şirului de numere din coloana din dreapta a fig. 10.1 arată că dacă se continuă procedeul timp de 10 generaţii se pot obţine vite care posedă ereditatea caracteristică rasei „cu coarne" în proporţie de 1 023 din 1 024; restul păstrează totuşi nemodificat determinantul caracterului dorit, adică „fără coarne".

O teorie a eredităţii care ar accepta existenţa cît de cît a unei contopiri va prezice că schema de încrucişări care a fost expusă mai sus pentru menţinerea caracterului „fără coarne" va eşua, datorită atenuării, sub presiunea retroîncrucişărilor repetate, a caracterului respectiv. Nu numai că un asemenea fapt

Scanned with OKEN Scanner

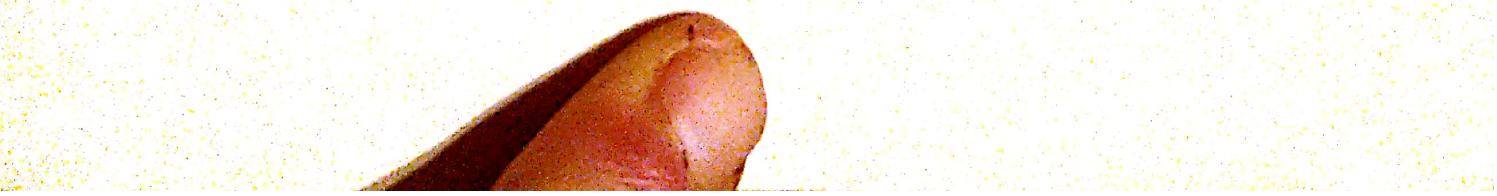
nu se produce, dar nu are loc nici măcar o diminuare a frecvenței de apariție a acestui caracter în generațiile succesive obținute prin retroîncrucișări. Această frecvență rămîne constantă, aproximativ jumătate din animalele fiecărei generații fiind lipsite de coarne.

Situația discutată mai sus este un caz special, ales înadins; rezultatul nu este tot atît de clar în cazul unui caracter care este expresia acțiunii cumulative a mai multor gene avînd fiecare un efect individual de mică amploare (ereditate poligenică). În general, caracterele la care se înregistrează o variație continuă mai degrabă decît una de tipul „totul sau nimic" au o bază poligenică și din această cauză sugerează, la prima vedere, aparența de contopire. O analiză mai amănunțită va arăta însă în mod invariabil caracterul superficial al acestui aspect. În ceea ce privește determinanții ereditari, indiferent de numărul lor, aceștia sînt transmiși, în fiecare caz în parte, ca unități, întocmai ca pietricelele unui mozaic care nu se contaminează dacă sînt amestecate cu altele.

DESCOPERIRILE LUI MENDEL

Însușirile esențiale ale caracterului particulat al eredității au fost descoperite de Gregor Mendel, ale cărui experiențe epocale au fost publicate în 1866. Cu toate acestea, era mendeliană nu a început decît mult timp după moartea sa. În 1900, opera sa neglijată a atras, în mod independent, atenția a trei cercetători: De Vries, Correns și Tschermak.

Articolul lui Mendel asupra eredității la mazăre rămîne pînă în zilele noastre un model de metodă experimentală și de stil științific. Cercetînd legile ce guvernează modul de distribuire a caracterelor printre descendenții unei încrucișări inițiale, Mendel a scos în evidență faptul că predecesorii săi au neglijat „să determine numărul formelor diferite sub care apar descendenții proveniți din hibrizi, să sorteze cu grijă aceste forme în raport cu generațiile cărora le aparțin sau să încerce să stabilească relațiile statistice dintre ele". Metoda mendeliană constă deci în următoarele: se face o încrucișare controlată, se sortează descendenții în clase, se numără aceste clase și indivizii care aparțin fiecăreia. Astăzi, după aproape un secol, aceleași metode, la



Scanned with OKEN Scanner

care nu s-a mai adăugat practic nimic, servesc la realizarea celor mai recente progrese în analiza structurii fine a genei.

Mendel a ales ca material experimental mazărea de grădină, deoarece, pe de o parte, aceasta este o plantă care se autopolenizează și la care, de regulă, încrucișarea nu poate fi realizată decît în mod artificial, iar pe de altă parte, pentru că există numeroase soiuri diferite ce se deosebesc prin culoare, formă etc. Din 34 de soiuri provenite de la cultivatori, el a ales 22 care, în decursul unei urmăriri timp de 2 ani, și-au păstrat nemodificate toate caracterele. Soiurile respective se deosebeau net între ele prin caracterele semințelor, cotiledoanelor, cojii seminței, păstăilor, florilor și tulpinii.

Pentru fiecare caracter diferențial, Mendel a efectuat inițial o încrucișare între două varietăți cu trăsături distincte, spre exemplu, între un soi înalt și unul scund. În fiecare caz, el a găsit că descendenții din prima generație (hibrizii F_1, în terminologia modernă) seamănă în mod invariabil cu unul dintre cele două tipuri parentale, fără a avea vreo importanță care dintre ele îndeplinea funcția de mascul și care pe cea de femelă. Caracterul parental care se evidențiază în generația F_1 a fost denumit de el „dominant", iar cel care nu apare — „recesiv". După cum a observat însuși Mendel, dominanța nu este un fenomen universal: la toate speciile, dominanța este incompletă pentru anumite caractere. Cu toate acestea, asemenea cazuri nu introduc în principiu nimic nou și ele nu vor fi examinate în mod special în cele ce urmează.

Mendel a lăsat apoi plantele din generația F_1 să se înmulțească prin autopolenizare. Generația a doua (F_2), astfel obținută, *nu* era uniformă, fiind alcătuită dintr-un număr de indivizi prezentînd caracterul dominant, alături de alții prezentînd caracterul recesiv, proporția dintre ei fiind de 3 : 1. Semnificația acestei *segregări* ordonate a caracterelor a apărut cu claritate după dezvoltarea generației următoare, obținută tot prin autopolenizare. A reieșit că formele dominante care alcătuiau trei pătrimi din generația F_2 erau de fapt de două tipuri distincte:

1. Un tip care dădea numai descendenți ce prezentau caracterul dominant, asemănători deci cu unul dintre soiurile parentale originare.

2. Un tip care dădea atît descendenți ce prezentau caracterele dominante, cît și descendenți avînd caracterul recesiv,

Scanned with OKEN Scanner

proporția dintre ei fiind de 3 : 1, întocmai ca la plantele generației F_1.

În generația F_2, plantele ce prezentau caracterul dominant și aveau o constituție „mixtă" erau de două ori mai numeroase decît cele „pur" dominante. Analiza completă a indivizilor din generația F_2 arăta prin urmare astfel : 1 dominant pur : 2 dominanți „micști" : 1 recesiv pur. În terminologia modernă, starea „pură" este denumită *homozigotism* (de la rădăcinile grecești : *homo* — același și *zygo* — a reuni) iar starea de „amestec" poartă numele de *heterozigotism* (*hetero* — diferit). Individul, plantă sau animal, poartă denumirea de homozigot sau, respectiv, heterozigot.

Rezultatele lui Mendel concordă în mod evident cu cel mai simplu model de structură particulată a eredității ce se poate imagina. Să examinăm descendenții unei încrucișări : înalt × × scund. La mazăre, caracterul „înalt" este dominant în raport cu „scund", astfel încît toți descendenții vor fi înalți. Deoarece însă caracterul recesiv „scund" reapare printre descendenții ce alcătuiesc generația F_2, ne putem da seama că în generația F_1 nu s-a produs o contopire a determinanților genetici ai caracterelor „înalt" și „scund". Să presupunem, în continuare, că dintre gameții produși de generația F_1 (grăuncioare de polen sau ovule), jumătate primesc determinantul caracterului „înalt" și cealaltă determinantul caracterului „scund". Întregul mod de desfășurare a evenimentelor poate fi prezentat acum ca în fig. 10.2, în care s-a notat cu T determinantul dominant „înalt" și cu t cel recesiv „scund". Homozigoții conțin doi determinanți de același tip, heterozigoții — doi determinanți diferiți.

Frecvențele previzibile deduse din aceste calcule simple de probabilitate sînt cele constatate efectiv și de către Mendel. Este necesar să se sublinieze că aceste legități sînt bazate pe probabilitate și, prin urmare, nu trebuie să ne așteptăm să le regăsim exact în rezultatele experimentale, tot așa cum șansa de 50% care guvernează rezultatul unei aruncări cu moneda nu ne garantează că dintr-o sută de aruncări va ieși de 50 de ori stema. Procentul previzibil de 50 este doar o limită către care tinde raportul determinat empiric pe măsură ce crește numărul de aruncări. Proporțiile mendeliene de 3 : 1 sau 1 : 2 : 1 reprezintă, de asemenea, și ele limite către care tind valorile rapoartelor empirice pe măsură ce crește numărul descendenți-

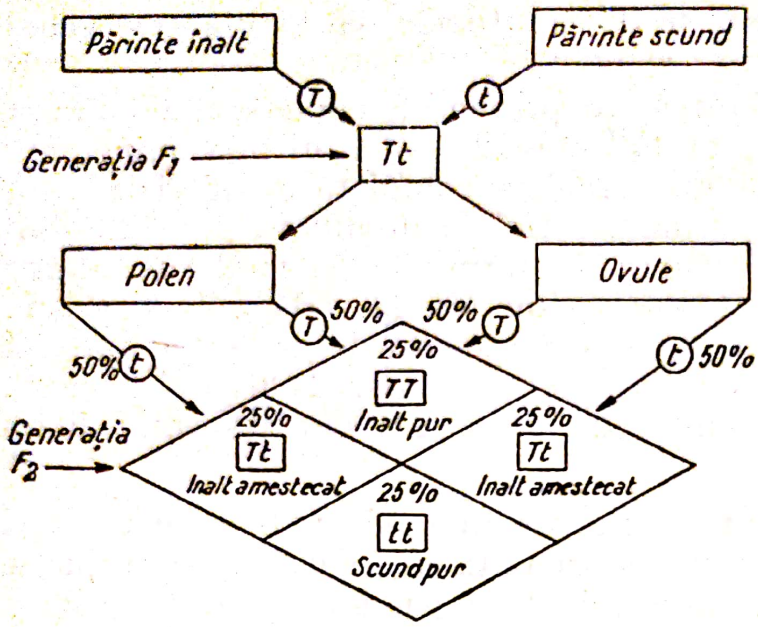


Fig. 10.2. Rezultatele încrucișării artificiale între mazărea înaltă și cea scundă, precum și ale fecundării naturale la descendenții acesteia.

Raportul mendelian 1 :2 :1 este consecința firească a ipotezei privitoare la formarea gametului în generația F_1 (vezi text).

lor cercetați. Aceste rezultate pot fi reproduse cu precizie printr-o experiență în care se extrag două pietricele de mozaic din doi saci conținînd fiecare un amestec în proporții egale de pietricele albe și negre. În aceste condiții este de așteptat să obținem unul dintre cele trei rezultate posibile, ale căror probabilități sînt redate în fig. 10.3. După un număr mare de asemenea extrageri,

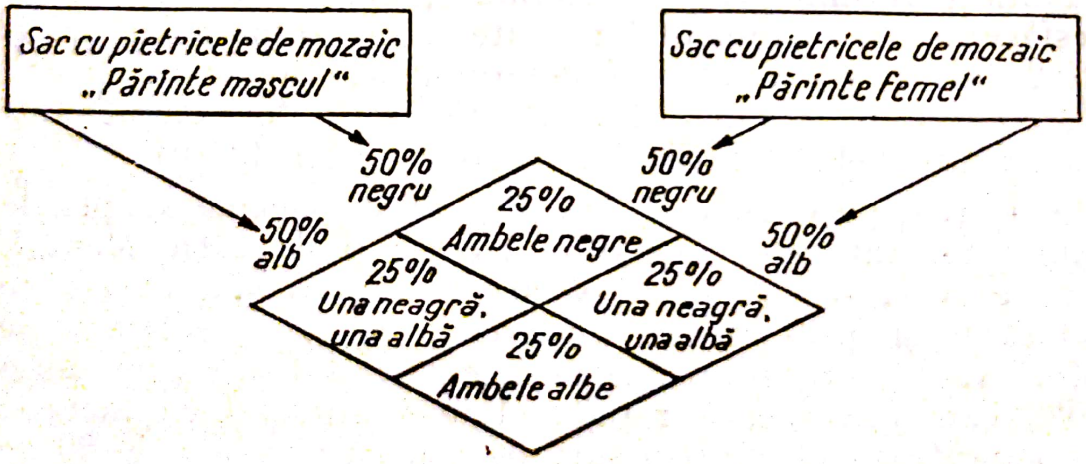


Fig. 10.3. Modalități de alcătuire a unui mozaic din perechi de cîte două pietricele luate una dintr-un sac, alta din alt sac, fiecare sac conținînd un amestec în părți egale de pietricele albe și negre.

Prin analogie cu schema din fig. 10.2, sacii corespund organelor sexuale ale indivizilor mascul și femel din generația F_1.

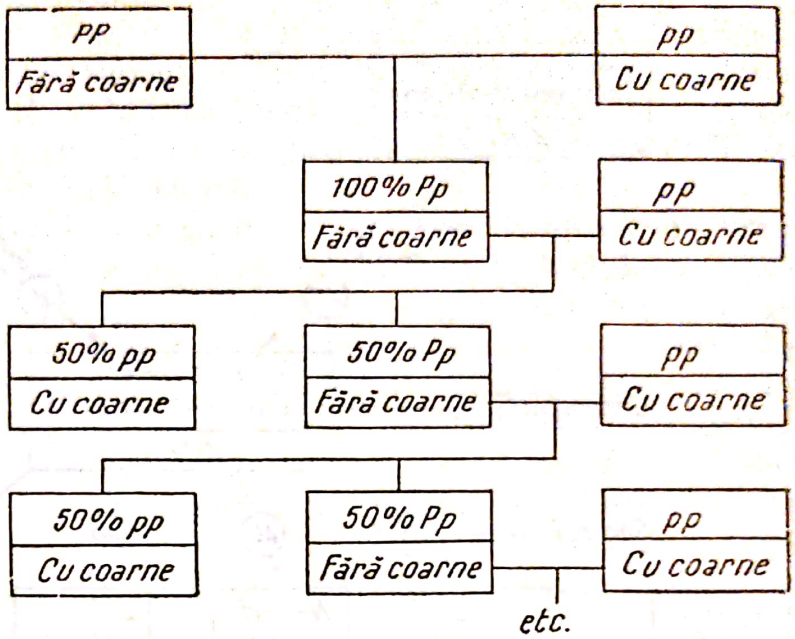
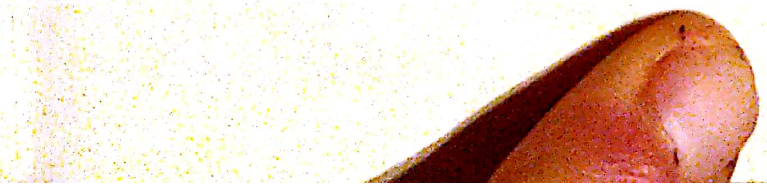


Fig. 10.4. Interpretarea mendeliană a experienței de încrucișare la bovide, ilustrată în fig. 10.1. *P* reprezintă factorul dominant, responsabil pentru caracterul „fără coarne" iar *p* reprezintă corespondentul său alelomorf recesiv.

cele trei clase: „ambele negre", „una albă și una neagră" și „ambele albe" vor apărea în proporția de 1 : 2 : 1. Dacă acceptăm în mod convențional ideea că „alb" și „negru" joacă rolul unor determinanți mendelieni, dintre care unul (să presupunem că cel negru) este dominant față de celălalt, raportul se reduce la valoarea 3 : 1. În medie, trei din fiecare patru perechi vor conține cel puțin o pietricică neagră.

Putem înțelege acum mai precis de ce un caracter mendelian nu poate fi eliminat prin diluție în cursul unor retroîncrucișări repetate. Notîndu-se cu *P* factorul ereditar dominant care determină caracterul „fără coarne" și cu *p* alelomorful său recesiv (de la rădăcinile grecești *allelo-* = altul, *morfo-* = formă), experiența de încrucișare a bovidelor poate fi ilustrată ca în fig. 10.4. Încrucișarea inițială dă naștere unei populații de animale fără coarne, heterozigotă, pentru ca ulterior fiecare generație să conțină proporții egale de animale fără coarne heterozigote și animale cu coarne, homozigote.

Reamintim că despre un caracter se spune că segregă atunci cînd printre descendenții care alcătuiesc o generație dată el ia forme alternative. În etapa următoare a cercetărilor sale, Mendel și-a pus întrebarea ce se întîmplă cînd se produce segregarea simultană a două caractere. Folosind exemplul de care s-a servit însuși Mendel, să presupunem că o plantă F_1 a primit de la un



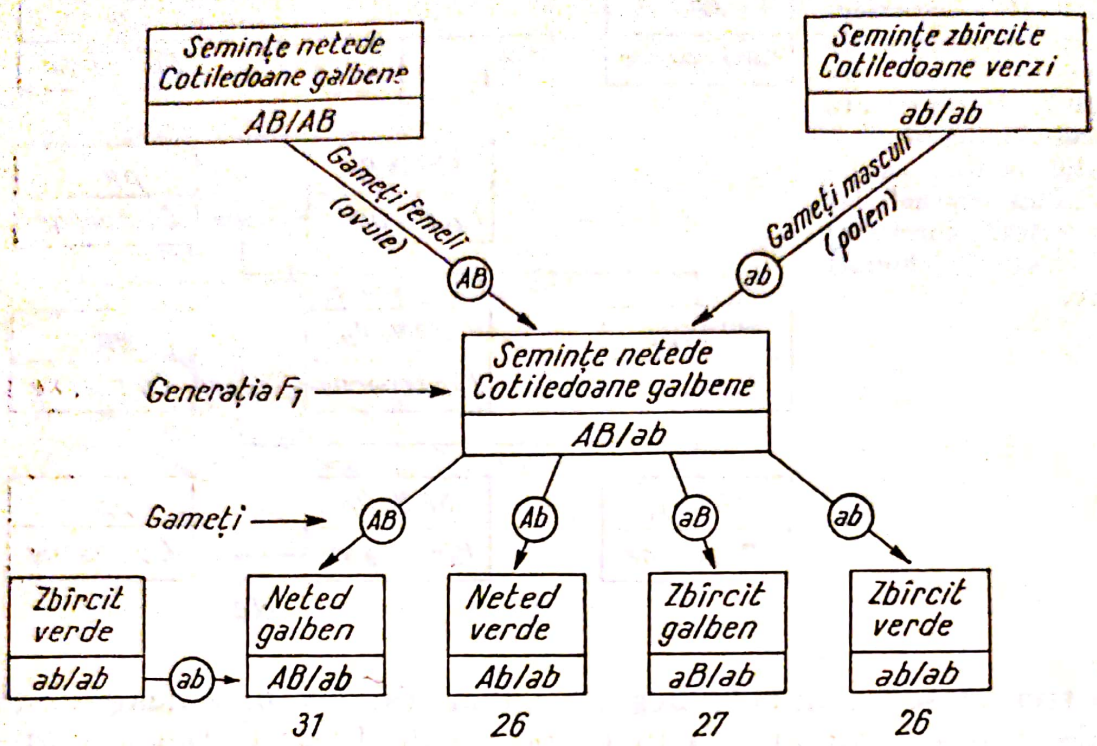


Fig. 10.5. Test pentru determinarea frecvențelor relative ale celor patru tipuri de gameți produși de către un dublu heterozigot.

Se procedează la o încrucișare cu un individ avînd două caractere recesive (semințe zbîrcite, cotiledoane verzi) și se numără descendenții care se distribuie în cele patru clase fenotipice posibile. Valorile redate sînt cele reale găsite de Mandel într-o experiență tipică.

A — factorul pentru semințe netede;
a — factorul pentru semințe zbîrcite;
B — factorul pentru cotiledoane galbene;
b — factorul pentru cotiledoane verzi.

părinte factorul „sămînță netedă" și factorul „cotiledon galben", iar de la celălalt caracterele „sămînță zbîrcită" și „cotiledon verde". Vor tinde oare factorii primiți laolaltă să se transmită împreună generațiilor următoare sau se va produce o redistribuire?

Aplicînd formula mendeliană plantei din generația F_1 despre care s-a vorbit mai sus, constatăm de îndată că, în principiu, se vor putea produce patru feluri distincte de gameți (fig. 10.5). Trebuie remarcat că în alcătuirea formulei genetice a plantei F_1 din figură, factorii moșteniți de la un părinte au fost grupați de o parte a unei linii oblice, iar cei primiți de la celălalt părinte — de cealaltă parte. Această convenție este folositoare deoarece

uşurează distincţia ce trebuie făcută între două forme de heterozigoţi dubli, respectiv unul care primeşte ambii factori dominanţi de la un acelaşi părinte, denumit heterozigot „convergent" notat cu *AB/ab* şi heterozigotul „divergent" care moşteneşte un factor dominant de la un părinte şi altul de la celălalt părinte şi care se notează *Ab/aB*.

Pentru a putea determina prin numărare frecvenţele cu care apar cele patru clase de gameţi arătate în figură, Mendel a efectuat experienţe de încrucişare între heterozigoţii dubli şi plante dublurecesive, obţinînd cele patru clase fenotipice corespunzătoare. În toate cazurile, el a observat un număr aproximativ egal de combinaţii noi şi vechi. Acest rezultat nu se modifică dacă heterozigoţii testaţi sînt în fază convergentă sau divergentă, deşi Mendel nu a cercetat el însuşi acest amănunt. Factorii care sînt moşteniţi laolaltă în asemenea experienţe nu au deci tendinţa să se menţină asociaţi atunci cînd sînt transmişi la descendenţi, ci se redistribuie la întîmplare.

Această concluzie, denumită uneori şi legea segregării independente, s-a dovedit ulterior a fi un rezultat frecvent, dar nu constant al unor experienţe de acest tip. În alte cazuri, se observă o înlănţuire a caracterelor (*„lincaj"** genetic), adică o tendinţă a factorilor genetici de a rămîne mai degrabă asociaţi în acelaşi mod în cursul transmiterii ereditare decît de a forma combinaţii noi. Descoperirii şi analizării fenomenului de lincaj i se datorează faptul că generaţia ulterioară de geneticieni a putut să lege schemele pur formale ale lui Mendel de anumite structuri intracelulare bine definite, cromozomii.

GRUPURILE DE LINCAJ, CROMOZOMII ŞI HĂRŢILE GENETICE

Ideea că determinanţii genetici sau *genele* — cum au început apoi să fie denumiţi — ar putea fi localizaţi pe cromozomi a fost enunţată în 1903 independent de către W. S. Sutton şi Th. Boveri. Ea decurge în mod logic din analiza diviziunilor celulare meiotică şi mitotică, expuse în capitolele precedente. Să examinăm mai întîi legea mendeliană a segregării, aşa cum este redată schematic în fig. 10.2 şi în conformitate cu care

* *Linkage* (în l. engleză) = înlănţuire (de exemplu, a verigilor într-un lanţ) — *N.T.*

Scanned with OKEN Scanner

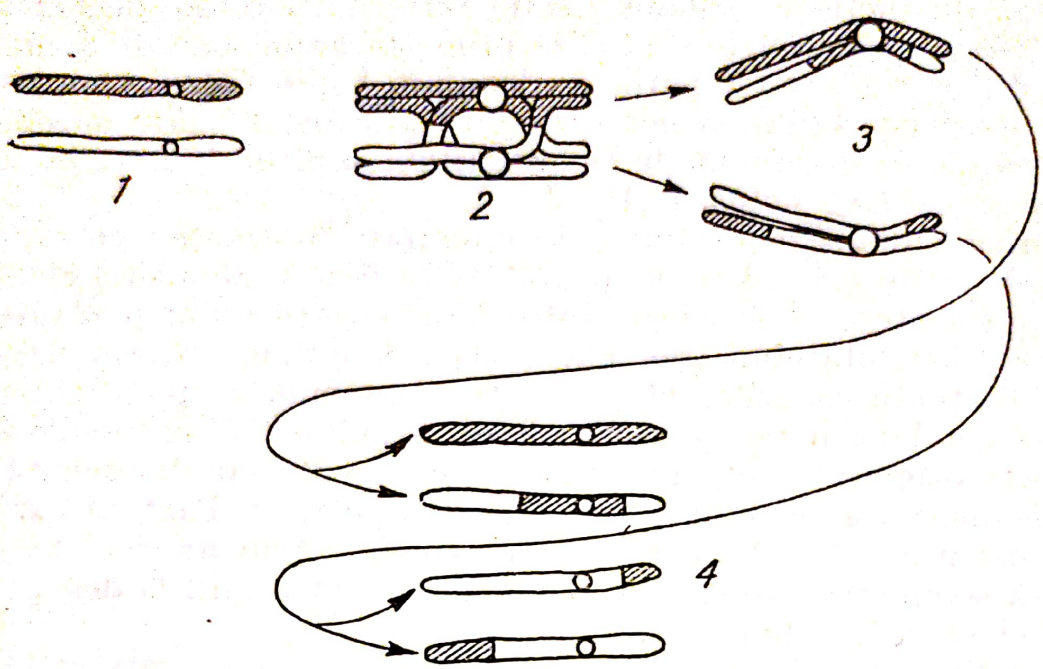


Fig. 10.6. Schema din fig. 7.5. este reprodusă aici cu adăugarea a două perechi de gene alelomorfe *T*, *t* și *A*, *a*, în scopul de a ilustra fenomenul de lincaj.

heterozigotul *Tt* din generația F_1 formează, în proporții egale, două feluri de gameți ce conțin fie determinantul *T*, fie pe cel *t*. Să presupunem acum că aceste gene alelomorfe *T* și *t* reprezintă structuri alternative ale unui anumit segment din cromozomii homologi ai unei anumite perechi cromozomiale, așa cum se arată în fig. 10.6. Urmărind soarta acestui cromozom pînă în stadiul de gamet, vom constata că exact jumătate din gameții rezultați din meioză vor conține forma *T* a segmentului cromozomial respectiv și jumătate vor conține forma *t*. Astfel, explicația raportului mendelian 1 : 1 derivă direct din comportarea cromozomilor în cursul meiozei.

Să ne oprim acum la transmiterea a două perechi separate de gene alelomorfe. Dacă cele două perechi sînt localizate în două perechi diferite de cromozomi, putem prevedea că ele se vor redistribui la întîmplare în cursul formării gametului (segregare independentă), deoarece mișcarea elementelor cromozomiale materne și paterne spre unul dintre cei doi poli ai celulei în diviziune este un fenomen supus întîmplării. Știm acum că aceasta explică observațiile lui Mendel asupra segregării independente la mazăre:

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 10.1

Încrucișare ilustrînd segregarea a trei gene lincate la șoarece

De remarcat că „plumburiu" (pb) și „zbîrlit" (zb) sînt caractere recesive, care își manifestă efectul numai cînd sînt prezente în doză dublă, în timp ce efectul caracterului „pătat" (pt) apare și în doză unică. Pe baza frecvențelor observate se poate trage concluzia că ordinea locusurilor este pb pt zb *și că* pt *este mult mai apropiat de* pb *decît de* zb.

	Genotipuri	Fenotipuri	Număr de descendenți examinați	Interpretare în termeni cromozomiali
Tată	*+pt + /pb + zb*	pete pigmentare		
Mamă	*pb + zb/pb + zb*	culoare plumburie și blană zbîrlită		
	+ pt + /pb + zb	pete pigmentare	107	*Crossing-over* absent
	pb + zb /pb + zb	culoare plumburie și blană zbîrlită	92	
	+ + zb /pb + zb	blană zbîrlită	12	*Crossing-over* între *pb* și *pt*
	pb pt + /pb + zb	culoare plumburie și pete pigmentare	3	
	+ pt zb /pb + zb	pete pigmentare și blană zbîrlită	52	*Crossing-over* între *pt* și *zb*
	pb + + /pb + zb	culoare plumburie	44	
	+ + + /pb + zb	tip sălbatic	3	Dublu *crossing-over*
	pb pt zb /pb + zb	culoare plumburie, pete pigmentare și blană zbîrlită	0	
			313	

(Date extrase din Snell, G. D., Dickie, M. M., Smith, P. și Kelton, D. E., „Heredity", *8*, 271, 1954.

caracterele alese de el s-a nimerit să fie determinate de gene localizate în cromozomi diferiți. Ce se va observa însă în cazul a două perechi de gene situate aproape una de alta pe un același cromozom, așa cum sînt *A*, *a* și *T*, *t* din fig. 10.6? Este evident că asemenea perechi vor păstra combinația originară (*A* cu *T* și *a* cu *t* în figură), cu excepția eventualității rare ca formarea chiasmei în cursul meiozei să se interpună între ele (cap. 7). Prin urmare, două asemenea gene nu se vor segrega independent, așa încît se va spune că prezintă fenomenul de *lincaj*.

Cînd chiasma se va forma între ele, atunci va apărea un *crossing-over* genetic, care va permite să se formeze combinațiile *At* și *aT*. Acestea sînt denumite *recombinanți*, deși în realitate sînt combinații noi. Frecvența cu care apar asemenea combinații noi printre descendenții unei experiențe de recombinare se numește frecvență de recombinare. Segregarea independentă corespunde unei frecvențe de recombinare de 50%. Cînd se constată o frecvență semnificativă mai mică de 50%, genele sînt lincate și se poate presupune că ele sînt dispuse pe un același cromozom. Un exemplu demonstrativ de lincaj la șoarece este redat în tabelul 10.1. Examinînd fig. 10.6 se poate vedea că, cu cît distanța dintre două gene așezate pe același cromozom este mai mică, cu atît mai rar vor apărea recombinări între ele. De aici se poate deduce că frecvența cu care se întîlnesc anumite tipuri recombinante printre descendenții obținuți în experiențe de încrucișare poate fi utilizată pentru măsurarea distanței dintre două gene lincate aflate pe un același cromozom. Utilizînd această metodă, T. H. Morgan și școala sa au putut să alcătuiască, în a doua decadă a secolului nostru, hărțile amănunțite ale celor patru cromozomi ai musculiței de oțet, *Drosophila melanogaster*. Ca rezultat al muncii lor și al celei a altor cercetători, pe hartă au putut fi localizate în ordine liniară aproximativ o mie de gene, unitatea de cartografiere fiind definită ca distanța ce corespunde unei frecvențe de recombinare de 1%. Pe distanțe scurte, unitățile de cartografiere se sumează, astfel încît dacă vecinii de o parte și de alta ai unei gene sînt așezați la distanța x și, respectiv, y unități, atunci distanța dintre genele extreme va fi de aproximativ $x + y$.

Figura 10.7 ilustrează harta genetică la *Drosophila melanogaster*. Se observă că toate genele au fost cartografiate în patru grupuri distincte de lincaj, pe baza faptului că fiecare genă dădea o frecvență de recombinare de 50% cu toate celelalte grupuri,

Scanned with OKEN Scanner

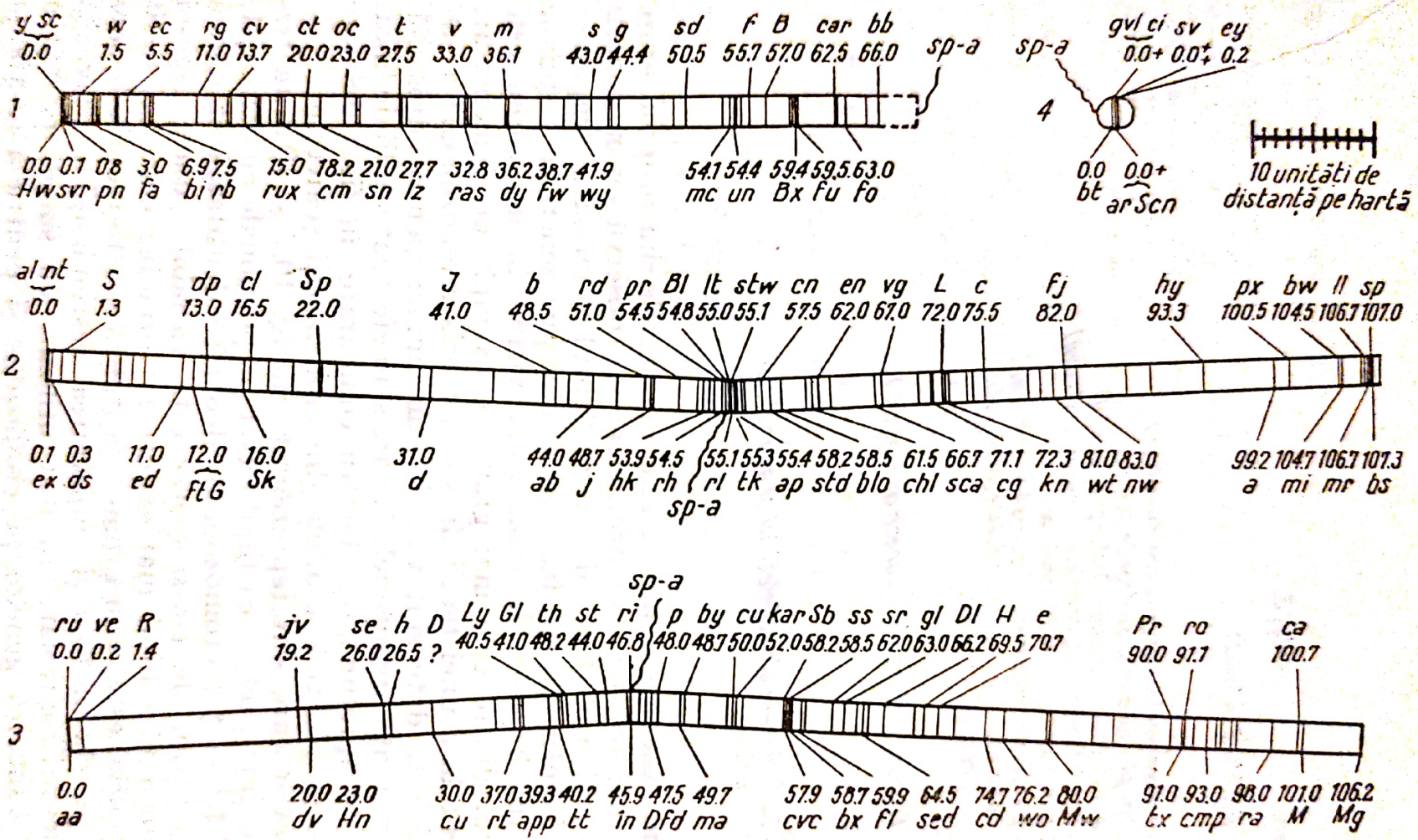


Fig. 10.7. Harta de lincaj la cromozomii de *Drosophila melanogaster*, ilustrînd o parte din mutaţiile care au fost cartografiate.

Centromerele sînt notate prin *sp–a*. (după Sinnott, Dunn şi Dobzhansky, 1950).

Scanned with OKEN Scanner

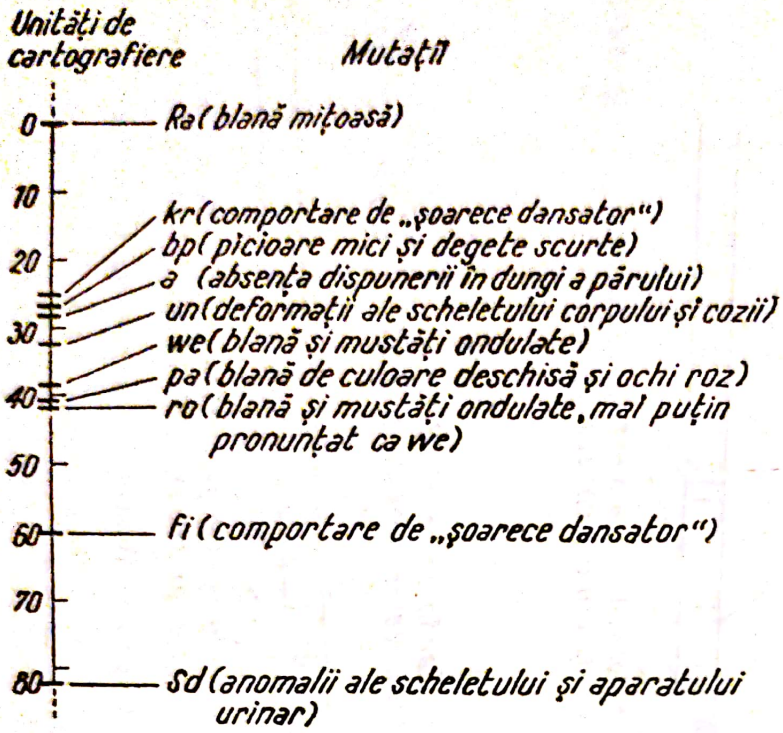


Fig. 10.8. Grupul de lincaj V la șoarece.

Unitățile de cartografiere au fost stabilite plecînd de la o origine arbitrară *Aa*. Fiecare mutație este reprezentată prin simbolul său convențional urmat, între paranteze, de descrierea unora dintre efectele sale fenotipice.

prezentînd însă fenomenul de lincaj cu genele din propriul grup. Numărul haploid de cromozomi care se observă cu mijloacele citologice la drosofilă este de patru. Faptul că numărul grupărilor de lincaj identificate pe baza criteriului pur genetic corespunde cu numărul haploid de cromozomi vizibil la microscop este poate unul dintre cele mai grăitoare exemple de demonstrare experimentală a unei teorii, în speță teoria cromozomială a eredității. (Aceste date sînt valabile nu numai pentru drosofilă, ci și pentru toate organismele la care s-au efectuat studii de lincaj suficient de aprofundate.) Pentru comparare, în fig. 10.8 este redată harta genetică a unuia din cromozomii șoarecelui.

Distanțele care sînt reprezentate în fig. 10.7 și 10.8 nu trebuie să fie interpretate ca fiind exact proporționale cu distanțele fizice de pe lanțul cromozomial, deoarece densitatea statistică a evenimentelor de *crossing-over* este variabilă, unele regiuni ale cromozomului fiind mai expuse la formarea chiasmei decît altele. Esențial este, prin urmare, faptul că aceste metode bazate exclusiv pe clasificarea și numărarea descendenților proveniți din încrucișări controlate au fost utilizate cu succes pentru a preciza localizarea genelor pe cromozomi și pentru a le aranja într-o ordine liniară definită.

Scanned with OKEN Scanner

Foarte rar se poate întîmpla ca o genă să sufere o modificare bruscă spre o nouă stare stabilă, în generațiile următoare fiind reprodusă apoi această formă nouă în locul celei vechi. Acest proces este cunoscut sub denumirea de *mutație*. Frecvența producerii spontane a acestui fenomen este de unul la 10^6 diviziuni celulare, frecvență ce poate fi însă mult mărită prin diferiți agenți fizici și chimici. Noțiunea de mutație cuprinde toate felurile de variații cromozomiale stabile, incluzînd pierderea definitivă a unui segment sau chiar a întregului cromozom (deleție), răsturnarea unui segment central al cromozomului, avînd ca efect inversarea ordinii genelor în porțiunea respectivă (inversie) și înlocuirea unui fragment rupt dintr-un cromozom cu un fragment provenit de la un alt cromozom (translocație). Un tip de alterare mai puțin severă este *mutația punctiformă*. Această noțiune se referă la conversia unui segment cromozomial de la o stare stabilă la alta, fără vreo modificare de poziție. Acest proces prezintă un interes deosebit, deoarece oferă posibilitatea unei definiri mai precise a genei, și anume drept cel mai scurt segment cromozomial care poate suferi o asemenea modificare. Această idee este ilustrată în fig. 10.9.

O altă cale pentru a determina unde se termină o genă și de unde începe următoarea ne-o oferă fenomenul de recombinare între două gene lincate. Conform acestui criteriu, gena este cel

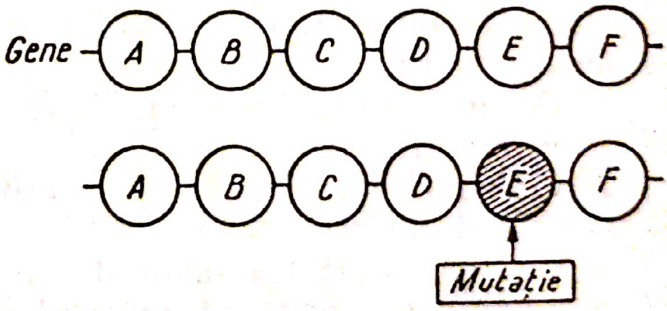


Fig. 10.9. Gena reprezentată ca o unitate de mutație (vezi text).

mai scurt segment cromozomial care poate fi separat prin *crossing-over* de segmentele imediat vecine. Fig. 10.10 ilustrează această concepție.

Nici unul din criteriile de mai sus nu poate fi aplicat însă fără luarea în considerare a activității funcționale a genei, dat

Scanned with OKEN Scanner

fiind că existența unei gene nu poate fi detectată decît prin examinarea efectelor sale. În perioada clasică a geneticii se considera în general că definițiile de mai sus ale genei, formulate în termenii noțiunilor de mutație și recombinare, trebuie să concorde nu numai între ele, dar și cu o a treia definiție, care

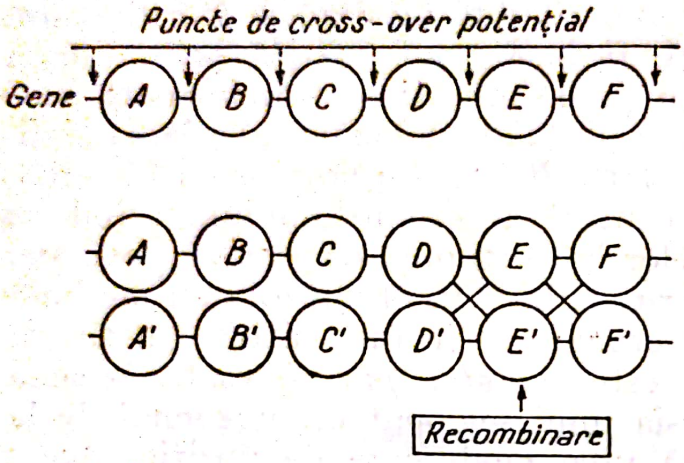


Fig. 10.10. Gena reprezentată ca unitate de recombinare.

Această schemă de *crossing-over* este pur formală. Împerecherea cromozomilor în meioză la un organism diploid implică în realitate patru lanțuri, așa cum este descrisă în cap. 7.

postula că fiecare genă poate fi identificată prin produsul său. În fig. 10.11 este prezentată o schemă în care genele apar din nou ca niște mărgele înșirate pe o ață, identificate de această dată după criteriul funcției. În 1945, Beadle a dat acestui criteriu un înțeles exact prin formularea: „o genă, o enzimă".

În rezumat, atîta timp cît studiile de lincaj nu au inclus analiza evenimentelor recombinaționale foarte rare, era natural și util să se considere că următoarele trei formulări definesc unul și același lucru:

1. Cel mai scurt fragment de cromozom care poate fi modificat prin mutație.
2. Cel mai scurt fragment de cromozom dintre două puncte potențiale de *crossing-over*.
3. Cel mai scurt fragment de cromozom în interiorul căruia orice modificare afectează un același produs, acesta din urmă fiind în unele cazuri și poate chiar întotdeauna o proteină specifică sintetizată sub control genetic.

Treptat, acest tablou a fost înlocuit printr-un altul mai precis, bazat pe demonstrarea faptului că entitățile definite prin criteriul prezentat în fig. 10.11 nu sînt aceleași cu cele redate în fig. 10.9 și 10.10. Mai exact, s-a găsit că genele definite prin

Scanned with OKEN Scanner

funcție ocupă un fragment cromozomial mult mai lung decît genele definite prin mutație sau recombinare. S-a constatat că unitatea funcțională conține mai multe sute de unități structurale, fiecare dintre acestea putînd suferi mutații și recombinări în mod repetat.

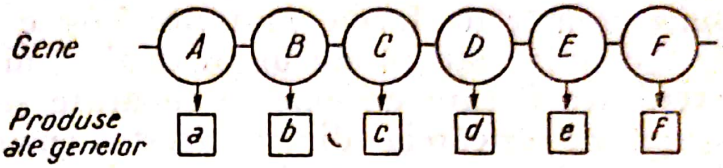


Fig. 10.11. Gena reprezentată ca unitate funcțională (vezi text).

Prima dovadă în sprijinul acestor idei a fost obținută în 1949 de către M. M. Green și K. C. Green, prin lucrări efectuate pe drosofilă, dar ele au fost greșit interpretate. Curînd după aceea, aceste rezultate, împreună cu alte observații analoge făcute în 1950 de către J. A. Roper, au fost interpretate în mod clar de către G. Pontecorvo, interpretare a cărei esență a fost amplu fundamentată prin cercetări experimentale ulterioare. Cerințele acestor experiențe au făcut ca în locul drosofilei să fie preferate microorganismele, în primul rînd, deoarece analiza detaliată a proceselor de mutație și recombinare se bazează pe identificarea unor evenimente care apar cu o frecvență de ordinul unu la cîteva sute de mii sau milioane. Prin urmare, cercetarea unor asemenea evenimente necesită cultivarea, clasificarea și numărarea efectivă a milioane de indivizi, sarcină care depășește posibilitățile cercetătorilor ce lucrează cu drosofila. Lucrînd cu microorganisme, obținerea prin cultivare a milioane de descendenți nu mai reprezintă o problemă, iar indivizii rari care prezintă proprietăți aberante pot fi izolați cu ușurință din masa populației prin utilizarea unor procedee de selecție adecvate.

Cel de-al doilea avantaj pe care îl oferă microorganismele este relativa precizie cu care pot fi definite caracterele studiate în termeni biochimici. Deși la drosofilă putem stabili unele raporturi între anumite puncte ale hărții de lincaj și, spre exemplu, forma aripilor sau culoarea ochilor, nu deținem totuși informații exacte asupra produsului genic, ale cărui efecte se manifestă prin caracteristicile aripilor sau ochilor. De asemenea, nu știm nimic despre treptele fizice și chimice care se interpun

între produsul genic (necunoscut) defectiv sau absent şi fenotipul defectiv. În cazul unor fungi, cum este *Aspergillus nidulans*, ne aflăm într-o situaţie mult mai favorabilă. Caracterele cu care se operează în genetica microbiană sînt în cea mai mare parte necesităţi nutritive simple. Astfel, forma normală de *Aspergillus* este capabilă să sintetizeze adenina din precursori simpli absorbiţi din mediul înconjurător. Cu toate acestea, au fost izolate un mare număr de forme mutante lipsite de această proprietate.

Adenina este produsul final al unui şir de reacţii chimice, catalizate fiecare de enzime separate şi specifice. O alterare a structurii oricăreia dintre aceste enzime poate fi suficientă pentru a bloca secvenţa în punctul respectiv, dînd astfel naştere fenotipului „adenino-deficient" (care necesită adenina). Prin urmare, faptul că apar două mutante adenino-deficiente în mod independent nu este suficient pentru a ne îndreptăţi să presupunem că în ambele cazuri este implicată aceeaşi genă sau măcar acelaşi cromozom. Să încercăm să urmărim pas cu pas analiza genetică a unui asemenea caz, anume cel al mutantelor ad_8 şi ad_9 la *Aspergillus*. În acest scop, este necesar să cunoaştem următoarele date privind ciclul de viaţă al acestui microorganism.

Unirea a doi nuclei haploizi de *Aspergillus* duce, ca şi la organismele superioare, la stadiul de zigot diploid. Dar acest stadiu este tranzitoriu şi dă naştere imediat, prin meioză, unor forme haploide din care se dezvoltă forma vegetativă a microorganismului matur. Geneticianul are astfel posibilitatea să clasifice în mod nemijlocit indivizii apăruţi în urma meiozei, deoarece la organismele haploide genotipul se exprimă în întregime în fenotip, fără să mai intervină complicaţiile fenomenului de dominanţă şi recesivitate care este propriu organismelor diploide.

La *Aspergillus nidulans* este, de asemenea, posibil să se provoace, ca un eveniment rar, formarea de diploizi *stabili*, iar Pontecorvo şi şcoala sa au reuşit să exploateze apariţia aberantă a unor fenomene de *crossing-over* mitotic la aceşti diploizi drept un mijloc nou de cartografiere genetică. Amănuntele pot fi găsite în articolele originale, care sînt incluse în bibliografie.

DEFINIŢIA EXPERIMENTALĂ A UNITĂŢII FUNCŢIONALE

Să examinăm acum mutantele ad_8 şi ad_9 la *Aspergillus nidulans* şi modul în care se poate aplica la ele analiza mendeliană. Mai întîi se analizează separat fiecare formă mutantă, printr-un

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 10.2

Determinarea relațiilor de dominanță în cazul a două mutații independente la *Aspergillus nidulans*.

În cazul ambelor mutante, exprimarea fenotipică constă în incapacitatea de a sintetiza adenina. Analiza unifactorială a fost completată prin demonstrarea faptului că în fiecare caz heterozigotul segregă în raport de 1 : 1.

	Diploizi purtători ai mutantei ad_8		Diploizi purtători ai mutantei ad_9	
	Genotip	Fenotip	Genotip	Fenotip
Homozigot normal	ad_8^+/ad_8^+	normal	ad_9^+/ad_9^+	normal
Heterozigot	ad_8^+/ad_8^-	normal	ad_9^+/ad_9^-	normal
Homozigot mutant	ad_8^-/ad_8^-	adenino-deficient	ad_9^-/ad_9^-	adenino-deficient
Concluzie	ad_8^- este recesiv față de ad_8^+		ad_9^- este recesiv față de ad_9^+	

procedeu similar în esență cu cel pe care l-a aplicat Mendel în cazul mazărei înalte și scunde. În cazul experiențelor cu *Aspergillus*, deosebirea constă în aceea că putem identifica atît fenotipul celulelor echivalente cu gameții (celulele haploide ale formei vegetative a microorganismului) cît și fenotipul celulelor diploide. Analizele arată că mutațiile ad_8 și ad_9 sînt amîndouă recesive, după cum se poate vedea din tabelul 10.2. S-au adoptat aici în mod convențional simbolurile + și — pentru a desemna forma normală și, respectiv, pe cea mutantă. Simboluri ca ad_8 și ad_9 pot fi utilizate și fără semnul + sau —, dacă vrem să ne referim în mod general la segmentele cromozomiale care sînt alterate prin aceste mutații. Faptul că în aceste mutații sînt implicate două gene funcționale diferite (deși în fiecare caz rezultatul final constă în blocarea sintezei adeninei) a fost dovedit prin încrucișări de haploizi ad_8 cu haploizi ad_9. Diploidul F_1 este tranzitoriu și dă naștere imediat la celule haploide care pot fi testate individual pentru stabilirea dependenței sau, respectiv, independenței lor față de adenină. Se pot obține însă și diploizi persistenți. Rezultatele sînt ilustrate în fig. 10.12 și 10.13 și pot fi explicate admițînd că în aceste două mutații

Scanned with OKEN Scanner

sînt implicate două gene funcțional diferite și, prin urmare, două enzime diferite.

Comportarea în urma încrucișărilor la *Aspergillus* poate fi testată prin metode similare cu cele utilizate la studiul segregării simultane a două perechi diferite de gene la organismele superioare. În cazul mutantelor ad_8 și ad_9 s-a găsit că noile combinații

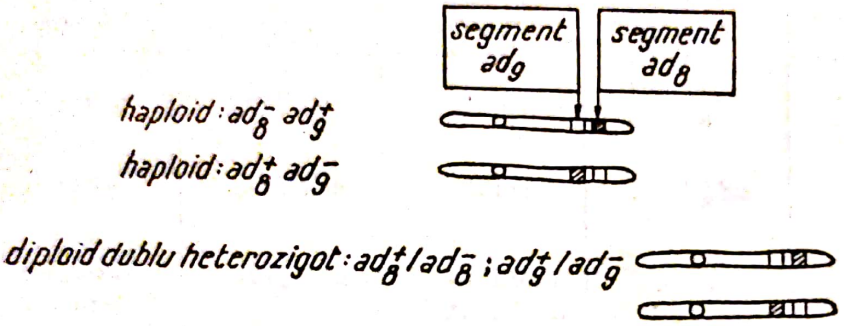


Fig. 10.12. Experiență cu *Aspergillus nidulans*.

Prima posibilitate: ad_8 și ad_9 sînt localizate în segmente diferite ale aceluiași cromozom. Organismul diploid dublu heterozigot posedă versiunea normală (+) a fiecărei gene și, prin urmare, este normal din punct de vedere fenotipic. Același lucru s-ar întîmpla dacă ad_8 și ad_9 ar fi localizate pe cromozomi diferiți. Din considerente grafice, în această schemă și în cele următoare segmentele ad_8 și ad_9 au fost desenate la o scară mult mai mare în raport cu restul cromozomului.

$ad_8^+ ad_9^+$ și $ad_8^- ad_9^-$ apar cu o frecvență de numai circa 16%. Restul de 84% din descendenți prezintă combinațiile parentale $ad_8^- ad_9^+$ și $ad_8^+ ad_9^-$. Rezultă deci că segmentele ad_8 și ad_9 sînt așezate pe același cromozom, fiind separate între ele prin aproximativ 16 unități de cartografiere genetică.

Să ne oprim acum la o a treia mutantă adenino-deficientă, ad_{16}, și să vedem ce se întîmplă cînd se examinează relația dintre ea și ad_8, cu ajutorul aceluiași procedeu analitic. Se constată că diploizii persistenți obținuți prin combinarea tulpinii ad_8^- cu tulpina ad_{16}^- sînt adenino-deficienți ca și părinții lor. Rezultă

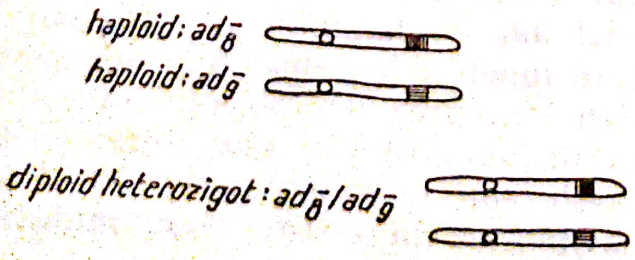


Fig. 10.13. Experiență cu *Aspergillus nidulans*.

A doua posibilitate: ad_8^+ și ad_9^- reprezintă diferite stări defective ale aceleiași gene funcționale.
Heterozigotul diploid nu ar poseda deci o versiune normală a genei, ci două gene defective. Prin urmare, fenotipul ar fi deficient în adenină.

Scanned with OKEN Scanner

că aceste două mutații trebuie să afecteze aceeași genă funcțională, perturbînd pe căi diferite sinteza aceleiași enzime. Care sînt, în acest caz, criteriile pe baza cărora considerăm că ele reprezintă mutante diferite?

Cînd se încrucișează între ele două tulpini adenino-deficiente produse prin mutații care afectează aceeași genă funcțională, este normal să ne așteptăm ca celulele haploide formate de către diploidul tranzitoriu F_1 să fie toate adenino-deficiente. Această prezicere se adevereşte într-adevăr în majoritatea cazurilor. Dar metodele geneticii microbiene fac posibilă cercetarea efectivă a mai multor milioane de indivizi pentru a ajunge la identificare cîtorva celule aberante. Utilizarea unui mediu nutritiv lipsit în întregime de adenină și de compuși înrudiți cu aceasta, dar corespunzător în rest, duce la eliminarea din cultură a tuturor celulelor adenino-deficiente, permițînd în schimb creșterea și multiplicarea celor cîțiva indivizi capabili să sintetizeze adenina și care sînt eventual prezenți în cultură. În cazul mutantelor ad_8 și ad_{16} își pot face într-adevăr apariția asemenea celule, cu o frecvență de cîteva la zece mii. Tehnici subtile de analiză au arătat că marea majoritate a acestora nu apar printr-o nouă mutație, ceea ce arată că sîntem într-adevăr în prezența a două mutante diferite, dat fiind că au reapărut celule cu capacitate normală de sinteză a adeninei. Cum s-a putut produce acest fenomen?

Misterul a fost în întregime rezolvat prin dovedirea faptului că cele două mutații, ad_8 și ad_{16}, reprezintă alterații ale unor *părți* diferite ale aceleiași unități funcționale. Să presupunem că pentru a permite sinteza enzimei necesare întreaga unitate trebuie să-și păstreze forma originală. În acest caz, vor fi inactive atît ambele forme mutante, cît și diploizii heterozigoți persistenți formați prin combinarea celor două tulpini haploide. Această situație poate fi reprezentată schematic ca în fig. 10.14. Dacă diploidul tranzitoriu F_1 este lăsat să segrege, clasele de celule haploide rezultante vor fi în general tocmai cele ale primului și ale celui de-al doilea părinte în proporția 1 : 1. Pînă acum am neglijat însă posibilitatea apariției unui fenomen de *crossing-over*. Să presupunem că prin acest mecanism schimbul genetic se poate produce nu numai între segmentele cromozomiale care constituie suportul unor unități funcționale diferite, ci și *în interiorul* lor. Mai exact, care va fi consecința unui

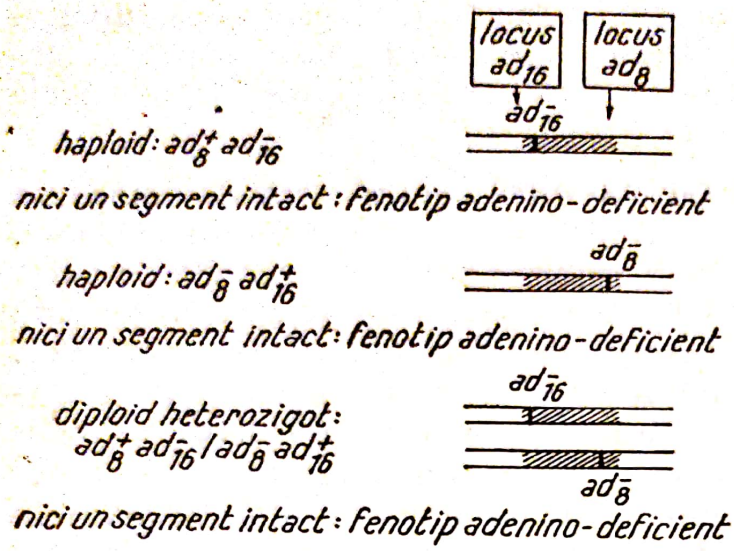


Fig. 10.14. *Aspergillus nidulans.*

Mutaţiile ad_8 şi ad_{16} sînt astfel figurate încît afectează locuri diferite ale aceleiaşi gene funcţionale (haşurată în schemă).

crossing-over produs în regiunea *dintre* cele două locuri afectate de mutaţiile ad_8 şi ad_9? Un asemenea eveniment este reprezentat schematic în fig. 10.15. Rezultatul constă în apariţia unui lanţ dublu defectiv şi a unui al doilea, care de astă dată nu mai conţine nici un defect şi în consecinţă este capabil să dirijeze sinteza integrală a enzimei deficitare. Descendenţii care au moştenit, după un astfel de *crossing-over*, un cromozom de tipul celui din urmă se vor comporta deci normal din punct de vedere

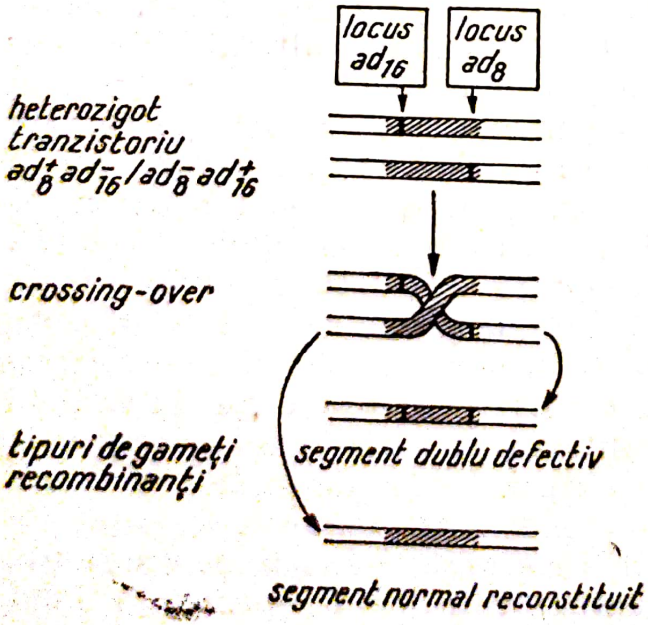


Fig. 10.15. *Aspergillus nidulans.* *Crossing-over* înăuntrul unui segment de cromozom (zona haşurată) care corespunde cu o unitate funcţională (cistron). Pentru simplificare s-a desenat numai cîte o singură cromatidă a fiecărui cromozom.

Scanned with OKEN Scanner

fenotipic. Astfel se explică apariţia fracţiunii minuscule de celule haploide adenin-independente, care au fost produse de diploidul tranzitoriu F_1 rezultat dintr-o încrucişare între cele două tulpini haploide ad_8^- şi ad_{16}^-.

În termeni mai formali şi extinzînd aceste concepţii la ereditatea diploidă normală, rezultă că avem de-a face cu moduri deosebite de exprimare funcţională a două genotipuri care sînt identice în toate privinţele, cu excepţia faptului că cele două locuri mutante sînt localizate fie în acelaşi cromozom, fie în cromozomii opuşi. În primul caz, se spune că locurile mutante sînt dispuse în poziţie *cis* (prefixul latin pentru „de această parte a"), în cel de-al doilea caz în poziţia *trans* (prefixul latin pentru „de cealaltă parte"). Cînd se constată o deosebire fenotipică între heterozigotul *cis*, care conţine un cromozom în întregime funcţional, şi heterozigotul *trans*, în care ambii cromozomi sînt defectivi, se vorbeşte despre un efect „*cis-trans*". Acest efect ne permite să definim unitatea funcţională în termeni pur genetici şi prin experienţe exclusiv genetice, chiar cînd nu dispunem de nici un fel de date asupra enzimelor interesate. Unitatea de funcţie poate fi deci definită drept acel segment cromozomial înăuntrul căruia operează un efect *cis-trans*. Seymour Benzer a dat acestei unităţi denumirea de *cistron*. Prin experienţe efectuate pe fungi, bacterii, virusuri şi drosofilă s-a ajuns la concluzia că în interiorul fiecărui cistron pot exista sute de unităţi de mutaţie sau de recombinare.

LIMITELE CARTOGRAFIERII GENETICE

Studiile experimentale ale lui Benzer asupra recombinării la virusurile bacteriene (bacteriofagi, denumiţi în mod curent „fagi" pentru prescurtare) au avut o influenţă considerabilă asupra geneticii moderne. Caracterele pe care le-a studiat în amănunţime au fost cele care determină proprietatea fagului de a se multiplica mai bine pe o anumită tulpină a bacteriei gazdă *E. coli* decît pe o alta. Deşi particula fagică nu poate fi văzută decît la microscopul electronic, ea îşi poate trăda prezenţa macroscopic în modul următor: o cultură de *E. coli* este lăsată să se multiplice pe un strat de agar întins într-o placă de sticlă, pînă cînd cultura acoperă cu o peliculă subţire suprafaţa

Scanned with OKEN Scanner

agarului. Pe suprafaţa culturii este răspîndită apoi o suspensie diluată de particule fagice, după care cultura este incubată în continuare. Ori de cîte ori un fag pătrunde într-o celulă bacteriană, aparatul biochimic al acesteia trece sub controlul genotipului agresor şi este utilizat pentru producerea de noi copii ale fagului originar. După ce au apărut aproximativ o sută de asemenea duplicate de fag, celula plesneşte, eliberînd fagii nou formaţi ce vor infecta celulele vecine în care se va repeta acelaşi ciclu. Succesiunea de evenimente iniţiată de fiecare particulă infectantă va duce la apariţia unei urme vizibile, de forma unei zone circulare clare, în interiorul căreia toate bacteriile au fost distruse. Asemenea zone poartă denumirea de plaje.

S-a vorbit mai sus despre genotipul fagului. Baza materială a acestuia este reprezentată de ADN fagic care, aşa cum ne putem aminti de la descrierea cuprinsă în cap. 7 şi 8, constituie practic singura componentă virală care ajunge de fapt în celula bacteriană. Mutaţiile ce apar în genotipul fagului pot fi detectate prin urmărirea efectului pe care îl produce fagul asupra gazdei, în mod particular prin urmărirea formării de plaje în culturi ale unor tulpini diferite de bacterii gazdă.

La bacteriofagul T_4 s-au putut distinge trei clase de mutaţii (*R*I, *R*II şi *R*III), în funcţie de tipul de plajă (normale sau de tip *r*) ce se formează în culturile a două tulpini de *E. coli* (vezi tabelul 10.3). După identificarea diferitelor mutaţii aparţinînd acestor trei tipuri, cartografierea poziţiilor lor relative pe cromozomul fagic poate fi realizată prin metode în esenţă similare cu cele ale geneticii clasice. Împerecherea unui fag cu un altul nu este posibilă, dar o cultură bacteriană poate fi infectată

TABELUL 10.3

Utilizarea a două tulpini de *E. coli* în vederea distingerii a patru tipuri genetice de bacteriofagi.

O plajă de tip r este mai mare decît cele normale iar marginea ei este net delimitată şi nu ştearsă

Tipul de fag folosit pentru infectare	Tipuri de plaje formate pe culturile a două tulpini de *E. coli*	
	Gazdă: tulpina B	Gazdă: tulpina K
normal	normal	normal
R I	tip *r*	tip *r*
R II	tip *r*	plaje absente
R III	tip *r*	normal

Scanned with OKEN Scanner

cu un amestec de două tipuri de fagi, într-o concentrație suficientă pentru a se asigura ca într-o mare proporție din celule să pătrundă reprezentanți ai ambelor tipuri. În cursul ciclului de multiplicare intracelulară care urmează, se produc evenimente analoge fenomenului de *crossing-over*. Printre particulele descendente poate fi detectată o mică minoritate la care diferitele porțiuni ale materialului genetic provin de la unul, iar altele de la celălalt tip fagic din amestecul originar.

Pentru a scoate în evidență analogiile cu sistemele mendeliene mai „ortodoxe" descrise anterior, vom examina ce se întîmplă cînd o cultură de bacterii din tulpina *B*, în mediu lichid, este pusă în contact cu un amestec de fagi *R* I și *R* II, în asemenea condiții încît practic fiecare celulă să devină dublu infectată. După desfășurarea ciclului de multiplicare a fagului și producerea lizei bacteriene, cultura poate fi centrifugată, recoltîndu-se supernatantul ce conține suspensia de particule fagice descendente, care sînt apoi însămînțate în vederea obținerii de plaje pe o cultură proaspătă pe agar a tulpinii gazdă B. După cum se poate vedea din tabelul 10.3, în absența fenomenului de *crossing-over* ar trebui să se formeze numai plaje de tip *r*. În realitate însă apare și o mică proporție de plaje normale, particulele de fag izolate din asemenea plaje păstrînd acest caracter în generațiile următoare. După cum se arată în fig. 10.16, acest

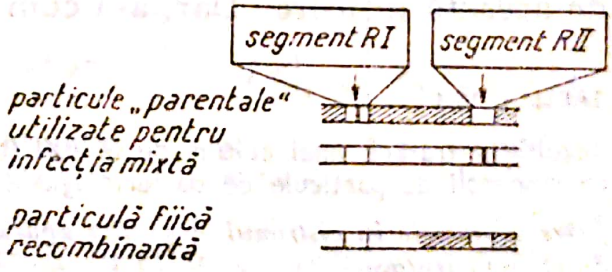


Fig. 10.16. Recombinare la bacteriofag.
Formarea unui descendent fagic normal în urma unei infecții mixte cu două tipuri diferite de mutante. Genotipul particulei fiice așa cum indică zona haşurată derivă în parte din unul, în parte din celălalt din cele două tipuri originare, prin analogie cu *crossing-over*-ul de la organismele superioare. Sectorul restrîns al segmentului *R* I sau *R* II modificat de mutație este marcat printr-o linie groasă verticală.

lucru poate fi interpretat ca o consecință a unui proces de *crossing-over* ce amintește schimbul de material dintre cromozomii homologi în cursul diviziunii meiotice la organismele diploide; frecvența apariției unor asemenea tipuri recombinate poate fi utilizată ca o măsură a distanței pe cromozomul fagic. Astfel se poate alcătui o hartă liniară corespunzătoare în același mod

Scanned with OKEN Scanner

în care s-a procedat şi pentru cromozomii drosofilei, cele trei grupuri de mutaţii *r* fiind dispuse pe această hartă în ordinea *R* II — R I — *R* III.

Concentrîndu-ne acum atenţia asupra regiunii *R* II, constatăm că toate mutaţiile produse aci se exprimă printr-un acelaşi fenotip, respectiv prin formarea de plaje de tip *r* pe tulpina gazdă *B* şi absenţa de plaje pe tulpina *K*. Această regiune a fost apoi disecată printr-o utilizare minuţioasă a testului *cis-trans*. La prima vedere nu reiese de loc limpede cum poate fi aplicat testul *cis-trans* la un asemenea material. Utilizînd pentru desemnarea mutantelor din regiunea *R* II simbolurile r_A^- şi r_B^-, iar pentru formele corespunzătoare nemutante simbolurile r_A^+ şi r_B^+, să încercăm compararea heterozigoţilor $r_A^- r_B^+ / r_A^+ r_B^-$ cu heterozigoţii $r_A^+ r_B^+ / r_A^- r_B^-$. Fagul este însă haploid din punct de vedere genetic şi ca atare nu există posibilitatea obţinerii unui heterozigot prin încrucişare. Cu toate acestea, infecţia mixtă imită starea de heterozigotism nu numai prin aceea că permite producerea fenomenului de *crossing-over* între particulele infectante, dar şi datorită faptului că face posibilă apariţia efectului *cis-trans* despre care s-a vorbit mai sus. Dacă este îndeplinită condiţia ca într-una sau cealaltă dintre particulele infectante să existe cîte o garnitură intactă din fiecare cistron, se vor forma plaje normale. Pe tulpina *K* de bacterii, nici fagii r_A^-, nici fagii r_B^- nu vor putea forma plaje, deoarece, aşa cum s-a arătat mai înainte, toţi fagii care prezintă mutaţii în regiunea *R* II sînt lipsiţi de această însuşire. Dar, aşa cum reiese din tabelul 10.4, infecţia

TABELUL 10.4

Rezultatul tratării unei culturi de *E. coli* (tulpina *K*) cu suspensii de particule de bacteriofagi.

Între o mutaţie în cistronul A şi alta apărută în cistronul B se produce fenomenul de complementare.

	Infecţie simplă	Infecţie simplă	Infecţie simplă	Infecţie simplă
Tipuri folosite pentru infecţie	$r_A^- r_B^+$	$r_A^+ r_B^-$	$r_A^+ r_B^+$	$r_A^+ r_B^- / r_A^- r_B^+$
Exprimare fenotipică	absenţa plajelor	absenţa plajelor	plaje normale	plaje normale

Scanned with OKEN Scanner

cu un amestec al celor două tipuri duce la apariţia de plaje normale. Linia oblică convenţională utilizată mai înainte pentru a simboliza genotipurile heterozigote la organismele diploide este utilizată, prin analogie, şi în acest caz, pentru a separa cele două componente ale infecţiei mixte. Concluzia care se poate trage din comportarea categoriei înscrise în ultima coloană din tabelul 10.4 este că inactivarea segmentului *B* (la stînga liniei oblice) nu perturbă funcţionarea segmentului *A*, aflat alături de el pe cromozom; acelaşi lucru este valabil şi pentru inactivarea segmentului *A*, din cromozomul notat la dreapta. *A* şi *B* sînt deci, într-adevăr, doi cistroni separaţi şi, cînd sînt prezenţi în particule diferite aflate înăuntrul aceleiaşi celule-gazdă, îşi pot complementa reciproc activitatea.

În cazul a două mutaţii produse în cadrul aceluiaşi cistron se obţine un rezultat cu totul diferit. Notînd asemenea forme mutante cu simbolurile r_{A1}^{-} şi r_{A2}^{-}, vom obţine imaginea prezentată în tabelul 10.5. Pentru a sublinia faptul că în acest caz nu se produce complementare, rezultatul infecţiei mixte este redat cu caractere italice. Dacă vrem să dobîndim certitudinea că

TABELUL 10.5

Absenţa complementării reciproce între două mutaţii localizate în acelaşi cistron.

	Infecţie simplă	Infecţie simplă	Infecţie simplă	Infecţie mixtă
Tipuri folosite pentru infecţie	$r_{A_1}^{-}r_{A_2}^{+}$	$r_{A_1}^{+}r_{A_1}^{-}$	$r_{A_1}^{+}r_{A_2}^{+}$	$r_{A_1}^{-}r_{A_2}^{+}/r_{A_1}^{+}r_{A_2}^{-}$
Exprimare fenotipică	absenţa plajelor	absenţa plajelor	plaje normale	absenţa plajelor

r_{A1}^{-} şi r_{A2}^{-} sînt într-adevăr mutaţii diferite ce produc defecte în porţiuni deosebite ale cistronului *A*, trebuie să dovedim că cele două mutaţii pot fi separate prin recombinare. În acest scop se infectează bacterii aparţinînd tulpinii *B* cu un amestec de mutante aparţinînd celor două tipuri, ambele capabile să se multiplice în această gazdă. După ce s-a produs o liză masivă, supernatantul este însămînţat pe o cultură a tulpinii *K*, pe care este de aşteptat ca nici unul dintre componenţii amestecului originar să nu formeze plaje. Cu toate acestea, se constată apa-

Scanned with OKEN Scanner

riția, cu o frecvență foarte scăzută, a unor plaje normale. Aceasta se datorește faptului că în cursul multiplicării în prima gazdă (tulpina *B*) s-au format recombinanți r^+_{A1} și r^+_{A2} prin *crossing-over* intracistronic. În esență, cazul este similar cu cel redat schematic în fig. 10.15 cu referire la *Aspergillus*.

După cum va reieși din cap. 12, astăzi se consideră că produsul unui cistron este de regulă un lanț peptidic care poate constitui el însuși o proteină completă activă biologic sau se poate agrega ulterior cu un alt lanț peptidic pentru a forma o proteină activă. Vechea formulare „o genă, o enzimă" a fost înlocuită în mod corespunzător prin formula mai precisă „un cistron, un lanț peptidic". O mutație într-un anumit punct de pe cistron va putea duce la una din următoarele consecințe posibile:

1. Modificarea structurii proteinei, fără tulburarea funcției sale (spre exemplu, unele hemoglobine anormale discutate în cap. 11).
2. Modificarea structurii însoțită de o pierdere a activității biologice (s-a arătat că unele mutații însoțite de pierderea activității unei anumite enzime duc la producerea unei proteine inactive, dar similare din punct de vedere imunologic cu enzima deficitară).
3. Pierderea totală a capacității cistronului de a dirija sinteza vreunei proteine.

DESCIFRAREA ÎN AMĂNUNT A HĂRȚII GENETICE

Întrucît recombinarea genetică poate avea loc și în interiorul cistronului, este posibil ca prin utilizarea unor metode în esență similare cu cele folosite de primii cercetători care s-au ocupat de drosofilă să se alcătuiască hărți genetice amănunțite ale acestor regiuni foarte mici și să se stabilească situarea diferitelor mutații într-o ordine liniară în interiorul cistronului. Diferența constă în aceea că avem de înregistrat frecvențe de recombinare de ordinul a cîteva nu la sută, ci la zeci de mii. Acest lucru a devenit realizabil prin studii cu microorganisme ce permit îmbinarea unor experiențe în care sînt cuprinși milioane de indivizi, cu utilizarea unor tehnici selective ce permit supraviețuirea a numai o parte din recombinanți, în timp ce restul sînt neviabili.

Scanned with OKEN Scanner

O grijă deosebită trebuie totuşi acordată controalelor care trebuie să probeze că unii presupuşi recombinanţi rari nu sînt de fapt mutaţii noi ce determină reversia la fenotipul normal.

Din toate microorganismele studiate pe această cale, fagul s-a dovedit cel mai adecvat pentru a permite „descifrarea pînă la ultimul amănunt a hărţii genetice", expresie folosită pentru prima dată de Delbrück şi prin care el înţelege o cartografiere amănunţită pînă la ultima limită posibilă. Gradul pînă la care a putut progresa fineţea analizei în cazul fagului poate fi apreciat după harta din fig. 10.17, care reproduce aspectul corespunzînd unor grade de mărire succesive. Concluzia cea mai importantă care se degajează din această muncă este legată de încercarea de a raporta mărimea unităţilor recombinabile, măsurată prin metode genetice, la dimensiunile moleculei de ADN. La fagul T_4, cantitatea de ADN care poartă informaţia genetică este de ordinul a $0{,}8 - 2 \times 10^5$ perechi de nucleotizi. Harta de lincaj obţinută printr-o extrapolare raţională ar putea cuprinde în totalitate aproximativ 800 de unităţi de cartografiere. Cea mai joasă frecvenţă de recombinare observată este de cca. $1{,}3 \times \times 10^{-4}$, corespunzînd unei distanţe de 0,013 unităţi de cartografiere. Cea mai scurtă distanţă de cartografiere observată este deci de 0,013/800. Înmulţind numărul perechilor de nucleotizi ($0{,}8 - 2 \times 10^5$) cu această fracţie (0,013/800), rezultă că numărul aproximativ de perechi ce corespund celei mai mici unităţi genetice recombinabile este de 1—3. Sursele de eroare posibile în ipotezele şi măsurătorile pe care se bazează acest calcul sînt considerabil de mari, ceea ce face şi mai izbitor faptul că rezultatul este atît de apropiat de valoarea minimă imaginabilă — anume că cea mai mică unitate genetică recombinabilă ar fi reprezentată de o singură pereche de nucleotizi. Un studiu recent al lui O.H. Siddiqui asupra recombinărilor cu frecvenţă joasă la *Aspergillus nidulans* a dus în esenţă la rezultate asemănătoare.

Se consideră în general că cea mai mică unitate de mutaţie are aceleaşi dimensiuni. Dovada recentă cea mai evidentă în sprijinul acestei concluzii este demonstrarea faptului asupra căruia vom reveni în cap. 12 că unele mutaţii apar prin adăugarea sau scăderea unei singure perechi de nucleotizi în molecula de ADN.

Scanned with OKEN Scanner

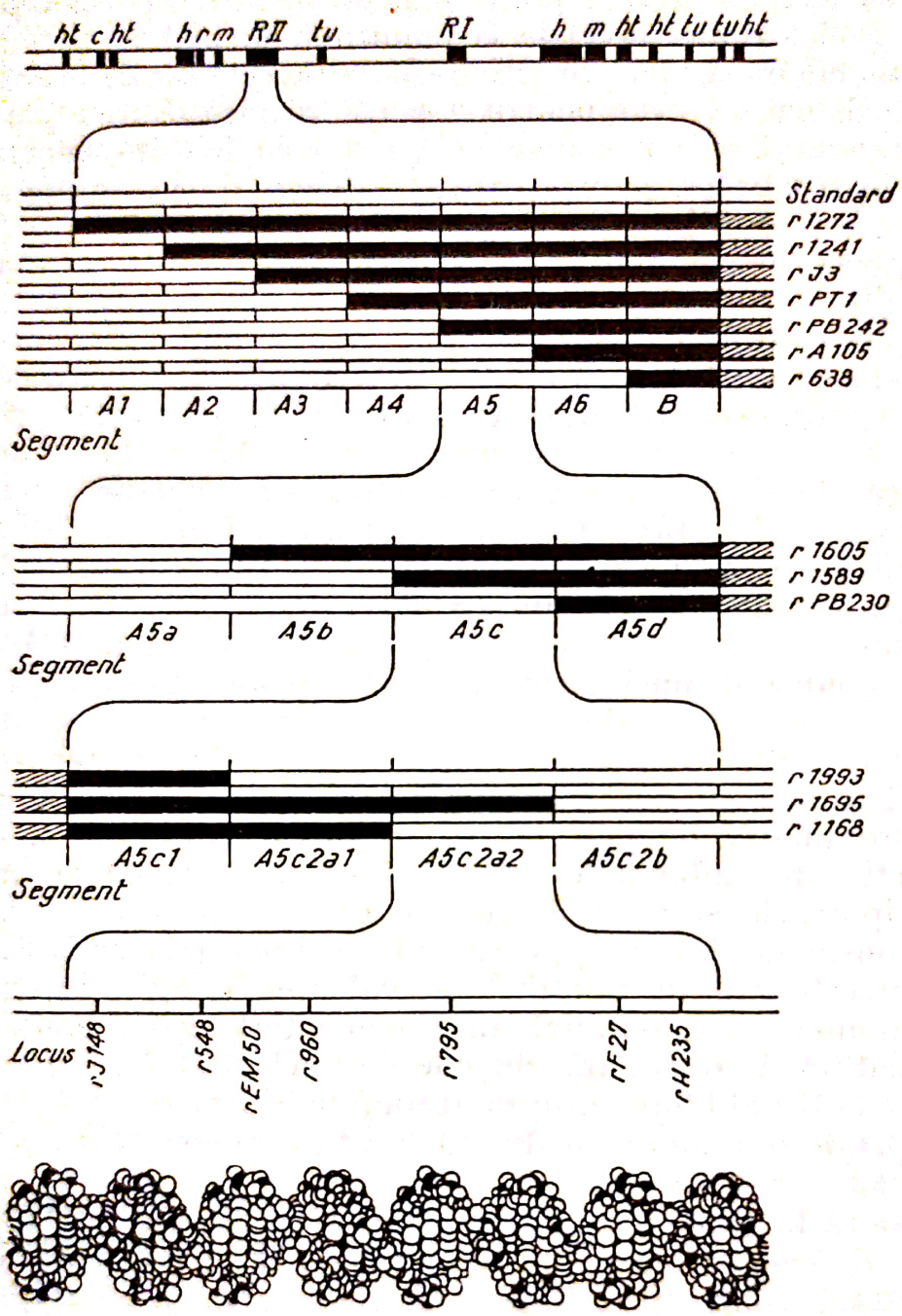


Fig. 10.17. Harta genetică a cromozomului fagului T_4, cuprinzînd regiunea *R* II şi segmente ale acestei regiuni, înfăţişate la măriri succesive.

Ordinea celor 7 sedii mutaţionale înscrise în ultimul rînd şi distanţele dintre ele sînt încă provizorii. Fragmentul de moleculă de ADN (corespunzător fig. 9.3) inclus în acest desen are o lungime aproximativ corespunzătoare cu segmentul de material genetic redat în rîndul ultim al hărţii (după Benzer, 1962).

Scanned with OKEN Scanner

Cele expuse mai sus asupra unităţilor eredităţii constituie o bază de discuţie cu sprijinul căreia se poate înţelege de ce o muscă, un şoarece sau un om diferă unul de altul. Ele nu ne explică însă care este originea deosebirilor funcţionale dintre celule cu acelaşi genotip. Această problemă ocupă un loc central în studiile asupra diferenţierii şi specializării ţesuturilor la organismele superioare. Problema poate fi ilustrată prin exemplul sintezei hemoglobinei. Nu ştim de ce genele care specifică lanţurile peptidice ale hemoglobinei sînt active în celula eritroblastică în care se sintetizează hemoglobina şi inactive în celelalte celule ale organismului care posedă, toate, o garnitură diploidă de cromozomi identică cu cea a eritroblastului. În mod analog, genele care specifică, spre exemplu, secvenţele de aminoacizi din lanţurile peptidice ale insulinei (sintetizată de celulele insulelor pancreatice) se află, în eritroblast ca şi în alte celule ale organismului, într-o stare oarecum latentă. Trebuie să existe un mecanism prin care majoritatea covîrşitoare a genelor din oricare celulă a unui metazoar sînt ,,deconectate", astfel încît să se exprime numai funcţiile specializate ale celulei respective. În stadiul de ignoranţă în care ne găsim încă în această problemă, nu putem decît să ne punem această problemă înainte de a ne îndrepta atenţia asupra unor fenomene înrudite care sînt mai bine cunoscute şi care ar putea să ne ofere o cheie pentru descifrarea enigmei diferenţierii. Aceste fenomene, studiate pentru prima dată la microorganisme, sînt reunite în general sub denumirea de adaptare enzimatică.

Sintetizarea de către microorganisme a unei serii de enzime necesită nu numai existenţa genelor corespunzătoare, ci şi prezenţa unui substrat specific sau a unei substanţe foarte înrudite cu el, care să acţioneze ca *inductor*. La bacterii, un anumit inductor determină adesea sinteza mai multor enzime, cîte una pentru fiecare verigă din lanţul de reacţii implicate în metabolismul substratului inductor. Fenomenul a fost denumit *inducţie enzimatică*. Se cunoaşte şi fenomenul invers, denumit *represie enzimatică*. (Trebuie să facem deosebire între represie şi un alt fenomen, de care nu ne vom ocupa aici, denumit ,,inhibiţia prin produs final" [*feed-back*]. Acest din urmă termen se referă la inhibarea activităţii — şi nu a sintezei — unei enzime

Scanned with OKEN Scanner

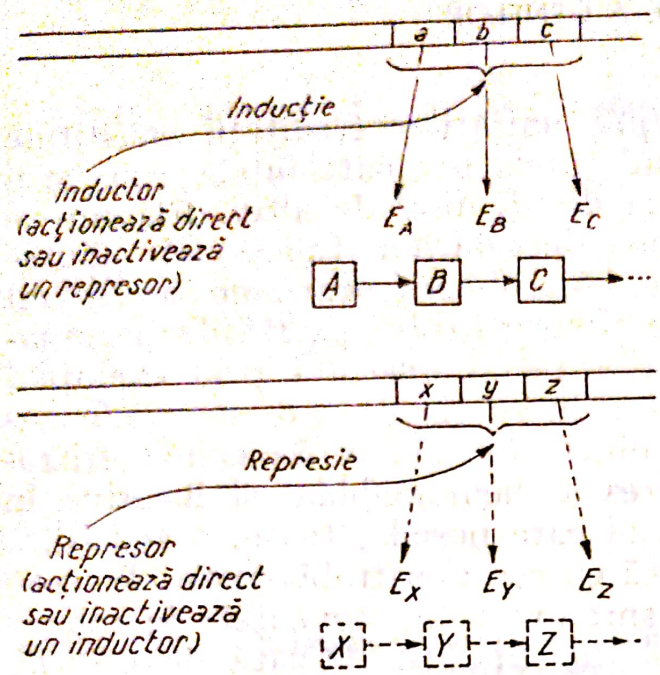


Fig. 10.18. Figura de sus arată modul în care are loc inducția enzimatică, iar cea de jos — represia enzimatică.

Substanțele formate în stadiile succesive ale unei secvențe metabolice sînt notate cu litere mari. E_A, E_B ... sînt enzime cu specificitate pentru substanțele $A, B, \ldots$; $a, b, \ldots$ sînt gene structurale care specifică structura enzimelor E_A, E_B, ... Schema prezentată se aplică în mod special la bacterii.

timpurii în cursul unei secvențe metabolice.) Cele două fenomene, inducția și represia, sînt reprezentate schematic în fig. 10.18.

Pe baza unor cercetări amănunțite consacrate sintezei diferitelor enzime bacteriene, Jacob și Monod au emis ipoteza că există un singur tip de mecanism de control, comun atît pentru inducție, cît și pentru represie. Teoria lor a lărgit considerabil imaginea noastră asupra organizării materialului ereditar, în special prin introducerea unei noi categorii de gene, genele reglatoare.

Prima problemă pe care o ridică orice încercare de a trata inducția și represia în termenii unui mecanism de control unic este aceea de a determina dacă cei care stabilesc interacțiunea cea mai directă cu aparatul celular de sinteză a proteinelor sînt inductorii sau represorii. Din două una: ori fiecare celulă inductibilă conține în ea represori preformați care sînt inactivați de către inductori surpaadăugați, ori sinteza enzimatică represibilă depinde de inductori intracelulari ce sînt inactivați de represori externi.

Există dovezi care arată că prima dintre aceste alternative este cea reală. Bacteriile la care se constată fenomenul de inducție enzimatică suferă uneori mutații spre forma „constitutivă", în care enzimele ce fuseseră inductibile ajung să fie sintetizate

Scanned with OKEN Scanner

într-un ritm intens chiar fără adăugare de inductor. Dacă inductorii ar fi fost esenţiali pentru sinteza acestei enzime, mutaţia ar fi trebuit să aibă ca urmare formarea unui inductor specific intracelular. Dacă, pe de altă parte, în bacteria inductibilă este prezent un represor intracelular specific, atunci mutaţia ar trebui să împiedice sintetizarea în continuare a acestui represor. Ultima explicaţie pare mai probabilă, deoarece este mult mai uşor de conceput ca o genă să fie pur şi simplu inactivată de o mutaţie decît ca ea să sufere în mod fortuit o alterare de asemenea natură încît ulterior să formeze un produs activ specific. În sprijinul prezenţei represorilor intracelulari există şi alte dovezi obţinute prin experienţe de încrucişare la bacterii. În cazul încrucişării la bacterii, cromozomul mascul este transferat în celula femelă împreună cu foarte puţină citoplasmă. După fertilizare, ritmul de sinteză a unei enzime specificate de o genă de pe cromozomul mascul ajunge să depindă de inductorii sau represorii prezenţi în citoplasma celulei femele. Prin anumite experienţe de acest tip se poate arăta că o genă de pe cromozomul mascul este iniţial activă, astfel încît celula fertilizată se comportă un timp, din punctul de vedere al acestei enzime, ca o mutantă constitutivă ; după aproximativ o oră însă, enzima nu mai este sintetizată în absenţa unui inductor extern, adică după scurgerea perioadei iniţiale celula fertilizată se comportă ca o bacterie inductibilă. Calea cea mai simplă de explicare a unor astfel de rezultate este aceea de a presupune că în cursul acestei ore s-a sintetizat, sub controlul cromozomului mascul, un represor intracelular.

Mutaţia care converteşte o bacterie inductibilă la forma constitutivă nu determină nici o lezare structurală a enzimelor bacteriene, ci modifică numai *ritmul de sinteză* a unor enzime. Genele care poartă informaţia ce guvernează *tipul* de enzimă sintetizată de către celulă rămîn nemodificate. Cu toate acestea, asemenea modificări prezintă toate caracteristicile unei mutaţii adevărate. Aceasta duce la concluzia că procesul a afectat un alt segment al materialului genetic, şi anume unul care controlează ritmul de sinteză a unei sau mai multor enzime. Jacob şi Monod denumesc aceste segmente *gene reglatoare* şi presupun că ele controlează sinteza represorilor intracelulari. Genele care specifică secvenţele aminoacizilor din enzime sînt denumite de ei *gene de structură*. Uneori, lezarea unei gene reglatoare liberează de sub controlul celular nu o singură enzimă, ci o serie de enzime ; enzimele contro-

Scanned with OKEN Scanner

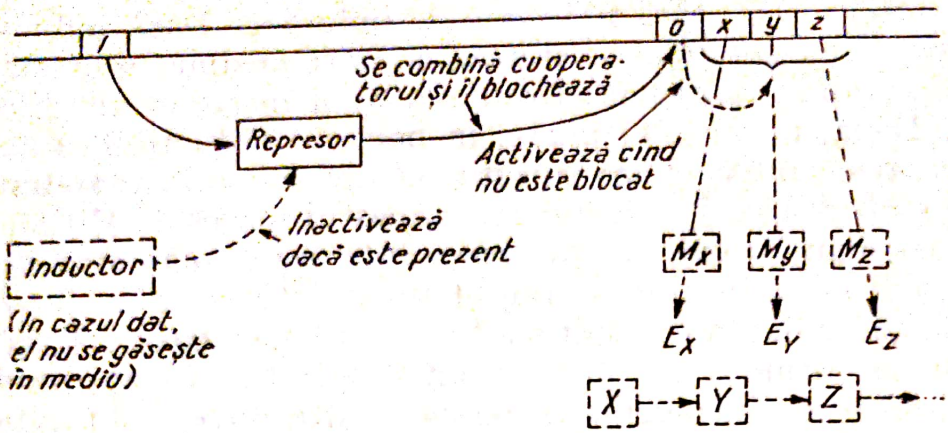


Fig. 10.19. Schema de jos din fig. 10.18 a fost din nou schițată, în spiritul principiilor care stau la baza teoriei de reglare genetică a lui Jacob și Monod. *i* — genă reglatoare. Genele structurale *x*, *y*, *z*, împreună cu operatorul constituie laolaltă un operon, iar produsele M_x, M_y și M_z sînt molecule de ARN mesager care codifică secvențele de aminoacizi, ale enzimelor E_x, E_y și E_z (vezi cap. 12). Liniile punctate reprezintă elemente ale sistemului care sînt „întrerupte" și rămîn latente în absența inductorului.

late laolaltă de o singură genă reglatoare sînt adesea enzime secvențiale, care acționează de-a lungul unei aceleiași căi metabolice, spre exemplu E_A E_B E_C din fig. 10.18. Se pare că genele de structură controlate de o singură genă reglatoare ocupă adesea pe cromozom locuri adiacente (*a*, *b*, *c* din fig. 10.18), chiar dacă gena reglatoare se poate afla într-o altă zonă a hărții genetice.

Efectul unor anumite mutații, care nu afectează nici genele reglatoare și nici genele structurale aflate sub controlul acestora, a dus la identificarea unui segment genetic specializat denumit *operator*. Represorul intracelular acționează asupra operatorului care este localizat în porțiunea terminală a grupului de gene de structură controlate de o genă reglatoare dată și determină operatorul să întrerupă activitatea lor „în bloc". Înainte de a trece la examinarea bazei experimentale a acestei teorii a reglării, ar fi util să o prezentăm într-o formă schematică. Acest lucru este realizat în fig. 10.19, în care schema inițială a inducției și represiei enzimatice a fost astfel redesenată, încît să cuprindă și elementele mai noi ale acestei teorii. Ne putem face o idee asupra dinamicii mecanismului propus dacă privim schema și ne imaginăm modificările pe care ar trebui să le sufere pentru a reprezenta starea de lucruri după introducerea în mediu a inductorului. Toate liniile punctate s-ar transforma în acest

Scanned with OKEN Scanner

caz în linii continue, iar săgeata care arată spre segmentul cromozomial „o" (operator), reprezentată printr-o linie continuă, ar trebui înlocuită printr-o linie punctată.

Jacob şi Monod au emis ipoteza că represorii intracelulari sînt proteine prevăzute cu două regiuni active diferite: una specifică pentru inductor şi una specifică pentru operator. Ei presupun că legarea inductorului poate altera structura terţiară a proteinei represoare (efect alosteric) într-un asemenea mod, încît locul prin care se leagă de operator se modifică şi represorul nu se mai poate lega de operator. Dacă represorii intracelulari sînt proteine, atunci atît genele de structură, cît şi genele reglatoare funcţionează prin determinarea unor secvenţe de aminoacizi în anumite proteine specifice. În principiu, toate genele pot fi deci etichetate cu ajutorul unui test cistrans ca fiind cistroni. Se poate presupune că lungimea segmentului de ADN corespunzător unei gene aparţinînd oricăruia dintre aceste tipuri cuprinde pînă la o mie de perechi de baze sau chiar mai mult. Despre segmentul operator se crede că este mult mai scurt.

Ceea ce este atractiv în teoria lui Jacob şi Monod poate fi ilustrat prin discutarea diferitelor consecinţe ale mutaţiilor ce afectează diversele tipuri de gene sau segmentul operator. În acest scop vom examina sistemul inductibil al lactozei la *E. coli*, pe care Jacob, Monod şi colaboratorii lor l-au supus unui studiu amănunţit. Ei au cercetat două enzime, implicate în metabolismul lactozei, sintetizate amîndouă ca răspuns la un acelaşi inductor, respectiv lactoza însăşi. Enzimele sînt β-galactozidaza, care desface lactoza în glucoză şi galactoză, şi tiogalactozid-transacetilaza, care acetilează tiogalactozizii. Alţi cîţiva compuşi înrudiţi cu lactoza au şi ei un efect inductor, care se exercită întotdeauna în măsură egală asupra ambelor enzime; cu alte cuvinte, o substanţă care nu induce sinteza galactozidazei va fi întotdeauna ineficientă în inducerea sintezei transacetilazei şi invers. Se poate presupune deci că sinteza acestor două enzime este controlată de aceeaşi genă reglatoare.

Rezultatele acestor experienţe sînt prezentate în tabelul 10.6, în care simbolul *x* este utilizat pentru gena de structură a galactozidazei şi simbolul *z* — pentru gena de structură a transacetilazei. Mutaţii apărute fie în gena reglatoare, fie în segmentul operator vor fi detectate ca „mutante constitutive"; ele sintetizează ambele enzime cu un ritm maximal, independent de prezenţa

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 10.6

Urmările prezise ale unor mutații ce afectează diferite gene ale sistemului inductibil al lactozei la *E. coli*.

Gena afectată de mutație	Enzime produse			
	În prezența inductorului		În absența inductorului	
	galactozidaza	transacetilaza	galactozidaza	transacetilaza
Nici una	+	+	−	−
Gene de structură *x*	−	+	−	−
Gene de structură *z*	+	−	−	−
Gena reglatoare *i*	+	+	+	+
Operator *o*	+	+	+	+

sau absența inductorului. Diferențierea lor este totuși posibilă din punct de vedere genetic. *E. coli* este genetic haploidă, dar este posibil, prin exploatarea unui fenomen special denumit sexducție, să obținem pentru un fragment scurt de cromozom o stare de diploidie stabilă ce cuprinde toate genele implicate în sistemul lactoză. Analiza genetică completă ce devine astfel posibilă separă mutantele constitutive în două clase distincte. Prima clasă este recesivă în raport cu forma normală, iar cea de a doua este dominantă. Acest rezultat poate fi interpretat în sensul că la una dintre cele două clase de mutante este afectată gena reglatoare, iar în cealaltă segmentul operator. Un heterozigot care dispune de o genă reglatoare defectivă va continua să producă represori datorită activității genei reglatoare normale prezente într-un singur exemplar. Microorganismul va prezenta deci un fenotip normal (inductibil). În schimb, un microorganism heterozigot pentru segmentul operator se va comporta fenotipic ca o mutantă constitutivă; operatorul defectiv prezent într-un singur exemplar va fi insensibil la represori și, prin urmare, va permite funcționarea continuă a genelor de structură *x* și *z* legate de el în cadrul aceluiași cromozom.

Cele două clase de mutante pot fi supuse unui al doilea test genetic bazat pe efectul *cis-trans*. Cu alte cuvinte, putem extinde schema de previziune nu numai asupra unor microorganisme care sînt heterozigote, după caz, pentru gena reglatoare sau pentru segmentul operator, ci și asupra genelor de structură *x* și *z*. Întrucît gena reglatoare influențează activitatea genelor *x* și *z* prin intermediul unui produs necromozomial (represorul)

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

şi nu direct prin contactul cu cromozomul, ar trebui să fie indiferent dacă prima se află într-o poziţie *cis* sau *trans* în raport cu ultimele. S-a constatat într-adevăr că acest raţionament corespunde realităţii. Pe de altă parte, operatorul este imaginat ca exercitîndu-şi controlul direct asupra grupului de gene de structură care se află alături de el pe cromozom. Dacă se notează cu o^- operatorul defectiv caracteristic mutantelor constitutive din cea de a doua clasă, se poate vedea că heterozigotul *cis* o^+x^+/o^-x^- se va comporta diferit faţă de heterozigotul *trans* o^+x^-/o^-x^+. În primul caz, galactozidaza va fi inductibilă, dar va exista o sinteză de tip constitutiv a proteinei (indiferent de natura ei) care este produsă de către gena de structură x^- afectată de mutaţie. (O asemenea proteină are din punct de vedere imunologic aceleaşi caracteristici antigenice ca şi galactozidaza, dar este lipsită de activitatea enzimatică a acesteia.) Pe de altă parte, în cazul poziţiei *trans* este de aşteptat ca proteina anormală să fie inductibilă şi în schimb galactozidaza să fie sintetizată constitutiv. Schema completă, verificată în practică, este redată în tabelul 10.7. Operatorul acţionează direct asupra

TABELUL 10.7

Deosebirea fenotipică dintre tipurile **cis** şi **trans** în cazul unui heterozigot dublu interesînd operatorul şi gena de structură **x** din cadrul aceluiaşi operon.

MRI — Materialul ce reacţionează încrucişat, adică un material care se aseamănă cu galactozidaza din punctul de vedere al caracteristicilor sale antigenice, dar este lipsit de activitate enzimatică

Genotipuri		Tipuri de proteine sintetizate	
		În prezenţa inductorului	În absenţa inductorului
Haploide	o^+x^+	galactozidază	nici una
	o^+x^-	MRI	nici una
	o^-x^+	galactozidază	galactozidază
	o^-x^-	MRI	MRI
Heterozigoţi diploizi	o^+x^+/o^-x^-	galactozidază + MRI	Numai MRI
	o^+x^-/o^-x^+	galactozidază + MRI	Numai galactozidază

genelor de structură învecinate de pe acelaşi cromozom, fără vreun intermediar necromozomial.

Ne-am concentrat atenţia asupra sistemului lactoză al *E. coli*, deoarece în acest caz mecanismele genetice de control au fost studiate în amănunt. Există însă toate motivele să se presupună că schema generală are o aplicare largă la alte sisteme şi organisme. Nu numai că este logic să includem în această categorie şi alte aspecte de inducţie şi represie enzimatică, dar este limpede că există cel puţin încă un fenomen care poate fi integrat în aceeaşi schemă generală, şi anume imunitatea conferită de profag (materialul fagic legat de cromozomul bacterian în infecţia nevirulentă) faţă de infectarea şi lizarea gazdei bacteriene de către alţi fagi de acelaşi tip. Dar discutarea acestui sistem ne-ar îndepărta prea mult de subiectul tratat aici.

Datele expuse în acest capitol fac să privim funcţia cromozomului ca fiind organizată pe mai multe trepte ierarhice de control şi coordonare. Eşalonul inferior al acestei ierarhii este reprezentat de perechile de nucleotizi care alcătuiesc unităţile fundamentale de mutaţie şi recombinare. Acestea sînt grupate în (i) gene de structură ce constituie unităţile de transfer de informaţie către enzime, (ii) segmentele operatoare care iniţiază transferul de informaţie de către genele de structură de sub controlul lor şi (iii) genele reglatoare capabile să scoată din funcţie acţiunea operatorului prin intermediul unui produs necromozomial, represorul. Fiecare operator alcătuieşte, împreună cu genele de structură care îi sînt asociate, o unitate coordonată de transfer de informaţie, denumită de Jacob şi Monod *operon*. Nu este exclus ca înşişi operonii să fie grupaţi în categorii superioare de coordonare a exprimării.

Am văzut cît de uimitor de departe ne-a condus analiza materialului genetic cu ajutorul metodelor pur genetice de încrucişare şi numărare. Încă din perioada iniţială, această analiză a fost ajutată şi completată prin atacarea paralelă a studiului însăşi structurii fizice, mai întîi prin examinarea citologică a structurii şi mecanicii cromozomiale, expusă pe scurt în cap. 7, şi ulterior prin determinarea fizico-chimică a structurii moleculare a ADN (cap. 9). Convergenţa finală a diferitelor moduri de abordare a făcut să fim astăzi în situaţia de a putea identifica în mod ipotetic unităţile de mutaţie şi recombinare cu perechile individuale de nucleotizi ce formează helixul de ADN şi unităţile de funcţie, genele de structură şi cele reglatoare cu secvenţe de aproximativ o sută de asemenea perechi.

Scanned with OKEN Scanner

Ajungem astfel într-un punct în care genetica confluează cu biochimia şi biofizica şi drumul ne conduce mai departe la o problemă centrală a biologiei contemporane : care este în amănunt mecanismul prin care secvenţa bazelor de nucleotizi ce alcătuiesc o genă determină secvenţa aminoacizilor cuprinşi într-un lanţ peptidic, produs al activităţii genei respective? Cunoştinţele noastre în acest domeniu s-au îmbogăţit cu o viteză spectaculară şi cunoştinţele actuale asupra acestui subiect sînt rezumate în cap. 12. Pentru a pregăti terenul în vederea acestei expuneri şi pentru a exemplifica unele progrese la nivel molecular realizate recent în genetica umană, vom analiza în capitolul următor un caz în care este posibil să se studieze detaliile efectului mutaţiilor asupra structurii proteinelor : hemoglobinele umane.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 11

HEMOGLOBINELE

După cum am văzut în capitolul precedent, o serie de progrese însemnate ale geneticii moderne derivă din cercetări efectuate asupra unuia dintre cele mai simple organisme: bacteriofagul. Este surprinzător faptul că progrese la fel de spectaculare au fost realizate şi într-un domeniu despre care ne-am fi aşteptat, poate, să fie mult mai complex: genetica umană. În ambele

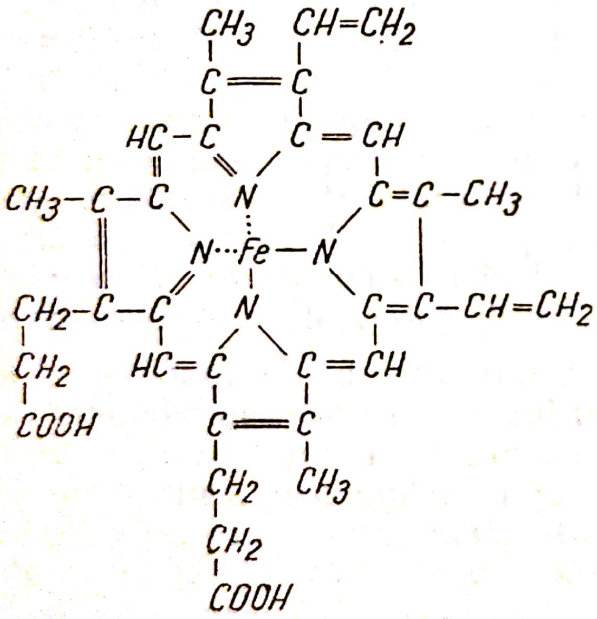


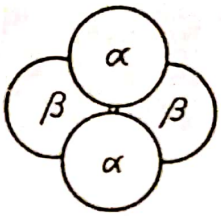
Fig. 11.1. Formula chimică a grupării de hem (protoporfirină feroasă).

domenii de cercetare poate fi exploatat acelaşi principiu, şi anume selecţia unor mutante rare din populaţii foarte mari. Cercetări efectuate pe întreg globul asupra hemoglobinelor umane anormale oferă posibilitatea identificării unor variante rare. Progresele recente asupra hemoglobinelor umane se bazează

Scanned with OKEN Scanner

pe astfel de cercetări, precum și pe datele amănunțite care au fost dobîndite asupra structurii acestei proteine.

Hemoglobina este o proteină de mărime mijlocie, avînd o greutate moleculară de aproximativ 66 700; fiecare moleculă conține patru grupări hemice (fig. 11.1). Fiecare grupare hemică este legată de cîte o subunitate moleculară; cele patru subunități alcătuiesc două perechi, fiecare subunitate fiind formată prin înfășurarea complexă a unui singur lanț peptidic (cap. 3). Subunitățile ce alcătuiesc hemoglobina omului adult normal de ambele sexe (HbA) sînt denumite α și β, astfel încît molecula poate fi reprezentată prin schema:



sau prin formula $\alpha_2\beta_2$.

ANEMIA CU HEMATII FALCIFORME (DREPANOCITOZA)

În urmă cu cincizeci de ani, Herrick, la Chicago, cercetînd sîngele unui student indian care prezenta o anemie, a remarcat că globulele roșii ale acestuia aveau o formă particulară, alungită, asemănătoare unei seceri. Ele îmbrăcau acest aspect cînd scădea presiunea parțială a oxigenului, spre exemplu, dacă erau lăsate mult timp sub o lamelă cu marginile parafinate (fig. 11.2). În sîngele bine oxigenat, eritrocitele aveau o formă aproape normală.

Curînd după aceea cercetările au arătat că acest tip de anemie cu hematii falciforme (denumită și drepanocitoză) se întîlnește și la alți bolnavi și că Herrick descrisese de fapt o nouă entitate patologică. Boala apare sub două forme: într-una există o anemie severă (drepanocitoza-boală), în cealaltă bolnavii nu prezintă simptome decît în condiții de anoxie severă, ca de exemplu în cursul unor zboruri cu avioane fără cabină etanșă. În ambele forme ale bolii, eritrocitele devin falciforme cînd sînt menținute într-o atmosferă cu o concentrație suficient de scăzută în oxigen.

Scanned with OKEN Scanner

Atît anemia severă, cît şi forma uşoară, care a primit denumirea de „tară" falciformă sau drepanocitoză-tară, sînt larg răspîndite, spre exemplu, în Africa centrală şi de vest, precum şi printre bărbaţii şi femeile ai căror strămoşi sînt originari din aceste zone. În una şi aceeaşi familie apar ambele forme de boală. În

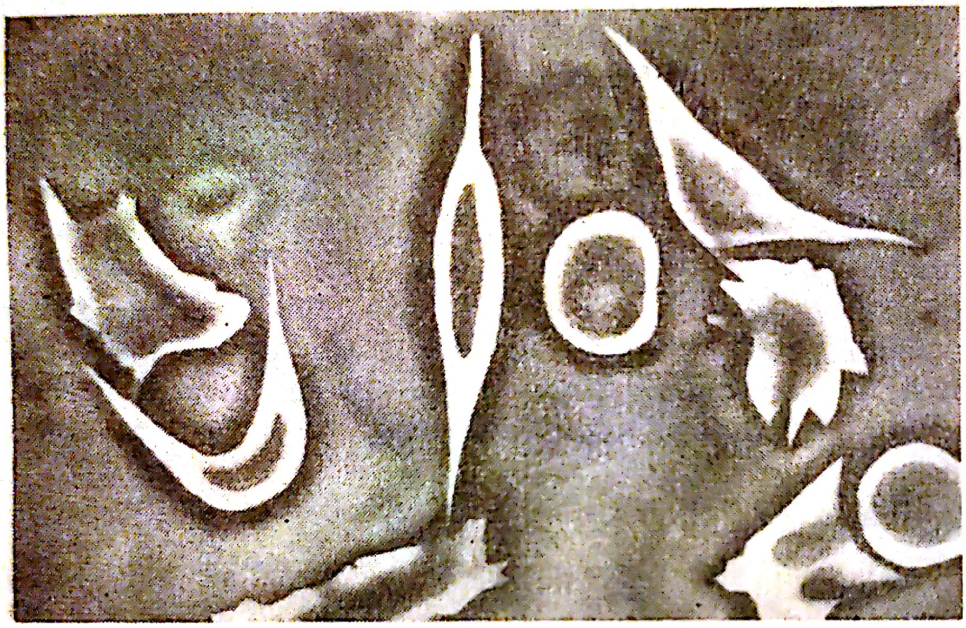


Fig. 11.2. Microfotografia unor hematii falciforme la microscopul cu contrast de fază (mărire aproximativă 1 500×) (după Bessis, 1956).

multe regiuni ale Africii, copilul cu drepanocitoză-boală moare înainte de a împlini vîrsta de doi ani, dar în condiţiile unui nivel de trai mai ridicat aceşti copii pot trăi mai mult.

În 1949, Pauling şi colaboratorii săi de la Institutul de tehnologie din California au cercetat, cu tehnica electroforezei, hemoglobina din globulele roşii ale bolnavilor cu drepanocitoză-boală. Ei au găsit că hemoglobina acestor bolnavi se comportă diferit faţă de hemoglobina din eritrocitele normale. Dacă cele două hemoglobine, sub formă de carboxihemoglobină, erau supuse separării electroforetice în aparatul Tiselius (cap. 2) la pH 6,9, hemoglobina din celulele falciforme se deplasa spre catod, în timp ce hemoglobina adultului normal se deplasa spre anod (fig. 11.3). Cele două hemoglobine difereau prin încărcătura liberă a moleculelor şi prin urmare între ele trebuia să existe o deosebire chimică. Scurt timp după aceea s-a arătat că gru-

Scanned with OKEN Scanner

pările prostetice, reprezentate în acest caz prin carboxiderivatul hemului, erau identice în cei doi compuşi; prin urmare, deosebirea trebuia să rezide în componenta proteică.

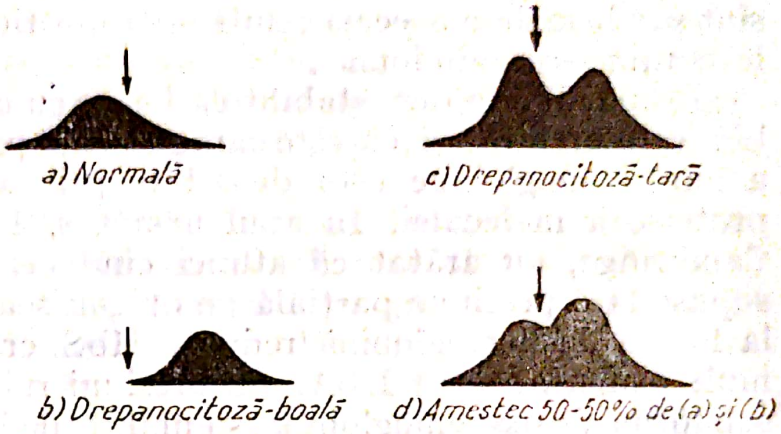


Fig. 11.3. Curbe de electroforeză în coloană de lichid, în soluţie de fosfat tampon la *p*H 6,9, ale carbon-monoxi-hemoglobinelor din hematii normale şi falciforme.

La acest *p*H, hemoglobina normală poartă o sarcină liberă negativă şi hemoglobina din hematiile falciforme — o sarcină liberă pozitivă. Săgeţile indică punctul de aplicare iniţială a preparatului (după Pauling şi colab., 1949).

În anul în care Pauling publica lucrările sale, Neel şi Beet au studiat în mod independent arborii genealogici ai unori familii în care era frecventă anemia cu hematii falciforme. Un arbore genealogic tipic al unei asemenea familii este reprodus în fig. 11.4.

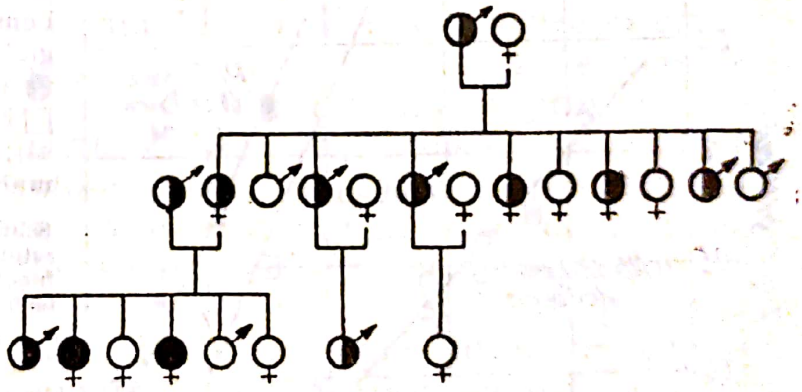


Fig. 11.4. Arbore genealogic exemplificînd moştenirea anemiei cu hematii falciforme (●) şi a caracterului falciform (◑); membrii familiei ale căror hematii nu sînt falciforme sînt reprezentaţi prin cercuri albe (○)

(după Neel, reprodus de Harris, 1959).

Se poate observa că un copil care a moştenit caracterul falciform de la ambii părinţi prezintă forma severă a bolii (drepanocitoza-boală), în timp ce la copilul care a moştenit acest caracter numai de la unul dintre părinţi se întîlneşte forma uşoară a bolii (drepanocitoza-tară). Cu alte cuvinte, homozigotismul pentru acest caracter se manifestă printr-o anemie severă, în timp ce heterozigotismul este asimptomatic sau se exprimă doar printr-o anemie moderată. Tabloul electroforetic a arătat că bolnavii homozigoţi posedă numai hemoglobină anormală, denumită

HbS, în timp ce la heterozigoţi aceasta din urmă coexistă cu hemoglobina normală (HbA). La indivizii cu drepanocitoză-tară toate globulele roşii au aceeaşi tendinţă de deformare în condiţiile unei presiuni joase de oxigen, ceea ce denotă că HbA şi HbS sînt produse de o aceeaşi celulă eritropoetică şi că toate hematiile le conţin pe amîndouă.

Prin 1950 era deci stabilit că boala cu celule falciforme se dobîndeşte ereditar şi că este caracterizată prin formarea în hematii a unei hemoglobine uşor deosebite prin structura componentei proteice a moleculei. În anul următor, Perutz şi Mitchison, la Cambridge, au arătat că atunci cînd cele două proteine sînt supuse la o presiune parţială de oxigen scăzută, adică sînt aduse la forma de hemoglobină redusă, HbS cristalizează din soluţie mult mai uşor decît HbA. La presiuni ridicate de oxigen, adică sub formă de oxihemoglobină, solubilităţile lor sînt egale (fig. 11.5). Cercetările acestor autori au arătat, de asemenea, că hemoglobina din celulele care au devenit falciforme se găseşte în formă paracristalină sau tactoidă. Cum în globulele roşii hemoglobina

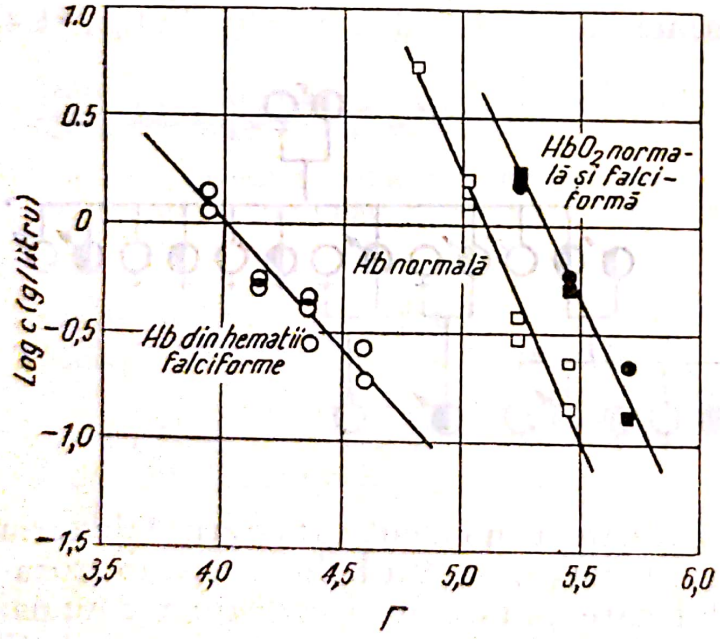


Fig. 11.5. Solubilitatea hemoglobinei normale şi a celei din hematii falciforme. ○ hemoglobină falciformă (redusă); ● oxihemoglobină falciformă; □ hemoglobină normală (redusă); ■ oxihemoglobină normală.

Solubilitatea ($\log_{10}$al concentraţiei de saturaţie în g/l) este reprezentată în funcţie de forţa ionică a soluţiei de fosfat tampon ($r = 1/2\ c_i z_i$, unde c_i este concentraţia fiecărui ion în moli/litru şi z_i — valenţa sa) (modificat după Perutz şi Mitchison, 1950).

se găseşte în concentraţie mare, cristalizarea aceasta este factorul ce determină distorsionarea hematiei şi apariţia aspectului falciform. Sîngele care conţine hematii falciforme este mai vîscos decît cel normal, celulele anormale avînd tendinţa de a se aglutina. *In vivo*, această aglutinare se produce în regiunile periferice

Scanned with OKEN Scanner

ale sistemului circulator, unde presiunea parţială a oxigenului este scăzută ; vasele sanguine se pot astupa cu conglomeratele de celule aglutinate. Drept urmare, anoxia devine şi mai pronunţată, ceea ce, la rîndul său, accentuează transformarea falciformă. O parte dintre celulele aglutinate pot suferi o hemoliză. Un astfel de tablou se observă la cei cu drepanocitozăboală, care acuză brusc „crize" dureroase în articulaţii, oase şi muşchi şi la care apar accidente vasculare în creier, rinichi şi splină.

În 1955—1957, tot la Cambridge, Ingram, lucrînd cu o metodă foarte precisă, a identificat deosebirile chimice dintre proteinele HbA şi Hbs. Tehnica a fost denumită a „amprentelor" şi a fost pusă la punct de Sanger pentru determinarea secvenţelor de aminoacizi din molecula de insulină. Într-o primă etapă, proteina este supusă unei hidrolize prin alcali sau prin enzime proteolitice. În cursul hidrolizei alcaline, legăturile peptidice sînt desfăcute la întîmplare ; dacă se utilizează enzime proteolitice, se realizează o scindare a moleculei în zone determinate, deoarece fiecare enzimă din această categorie desface lanţurile peptidice numai la nivelul unor legături peptidice specifice. (Tripsina scindează peptidele la nivelul legăturilor din vecinătatea lanţurilor laterale de lizină şi arginină, lăsînd intacte toate celelalte legături.) În al doilea timp al tehnicii, amestecul de peptide rezultat este depus pe o hîrtie de filtru şi separat prin electroforeză. Se roteşte apoi hîrtia cu 90° şi peptidele care au fost separate în cursul electroforezei sînt supuse unei cromatografii pe o direcţie perpendiculară electroforezei. Tipul de imagine („amprenta") care se obţine prin digestia triptică a hemoglobinei normale a adultului este prezentat în fig. 11.6. Au putut fi separate astfel 26 de fracţiuni, fiecare reprezentînd un peptid cu moleculă mică. Examinarea, prin aceeaşi tehnică, a HbS a dus la obţinerea unei imagini similare, cu singura excepţie că poziţia peptidului numerotat 4 se deplasase în cursul electroforezei spre polul negativ (fig. 11.7*a*). Fragmentul de hîrtie care conţinea această fracţiune a fost decupat şi analiza a arătat că peptidul 4 este alcătuit din 9 resturi de aminoacizi. Ingram şi Hunt au determinat apoi secvenţa acestor aminoacizi în peptidul din HbS şi în cel din HbA. S-a constatat existenţa unei singure deosebiri : în poziţia 7 a lanţului acidul glutamic era înlocuit de valină.

Scanned with OKEN Scanner

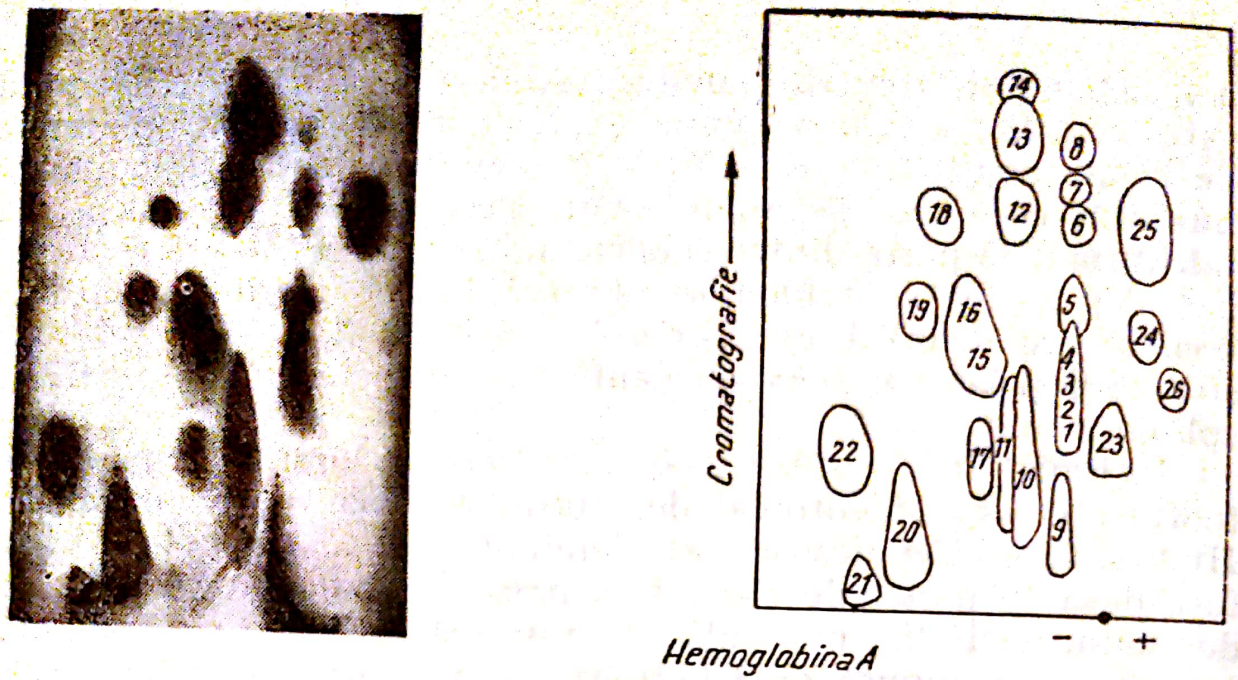


Fig. 11.6. Aspectul ,,amprentelor'' cromatografice obținute după digestia tripsică a HbA.

Hîrtia de filtru din stînga prezintă un aspect tipic, fiecare ,,spot'' (pată) corespunzînd unui peptid sau grup de peptide. Schema din dreapta arată diferitele peptide care, prin schimbarea condițiilor, pot fi identificate în acest tip de amprente și indică, de asemenea, numărul dat fiecărui peptid (după Ingram, 1961).

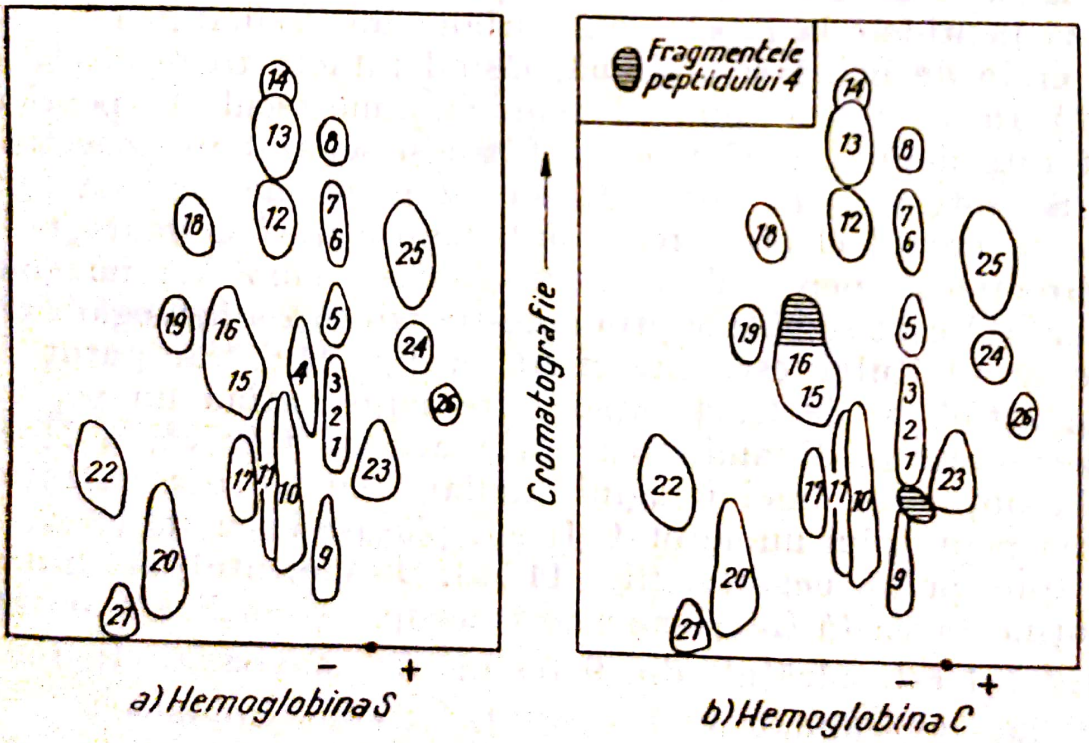
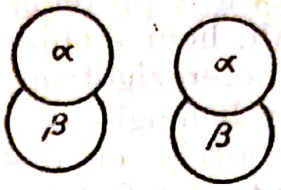


Fig. 11.7. Aspectul ,,amprentelor'' cromatografice ale HbS și HbC.

Amprenta HbS este identică cu cea a HbA (fig. 11.6), cu excepția faptului că peptidul 4 se găsește puțin mai la stînga în raport cu poziția lui originară. În amprenta HbC, o parte din peptidul 4 (acum scindat în două peptide — vezi text) se găsește deasupra peptidului 16, iar o parte între peptidele 9 și 23 (modificat după Ingram, 1961).

Scanned with OKEN Scanner

Am văzut mai înainte că molecula de hemoglobină este alcătuită din două perechi de subunităţi. Cînd are loc o scindare de tipul ilustrat în figura următoare:



jumătăţile sînt identice şi conţin fiecare aproximativ 300 de resturi de aminoacizi. Dintre acestea, în HbS era modificat numai unul. Secvenţa acizilor aminaţi era alterată numai în acest unic punct. Înlocuirea acidului glutamic, purtător al unei sarcini electrice, de către valină, lipsită de încărcătură, este răspunzătoare de deosebirile electroforetice observate iniţial de Pauling şi utilizate ulterior de către Ingram în experienţele sale de separare.

Prin urmare, Pauling a avut dreptate cînd, în 1949, a denumit drepanocitoza o boală moleculară, previziunea sa adeverindu-se întru totul: o alterare ereditară interesînd un singur aminoacid din fiecare jumătate a unei molecule de hemoglobină dă naştere unei hemoglobine a cărei solubilitate este scăzută la presiuni joase de oxigen; această hemoglobină va forma cristale în interiorul globulelor roşii, ducînd astfel la deformarea celulei şi la apariţia leziunilor vasculare obstructive caracteristice acestei boli.

Elucidarea naturii defectului (sau, mai bine zis, a erorii înnăscute) ce afectează sinteza hemoglobinei în drepanocitoza-boală şi -tară are un rol însemnat în fundamentarea concepţiei noastre asupra sintezei proteice în general.

În primul rînd, putem să ne dăm seama cît de precis funcţionează procesul de sinteză a proteinelor. Lanţul peptidic este caracterizat printr-o secvenţă precisă a anumitor acizi aminaţi; schimbarea, în anumite cazuri, a unui singur aminoacid poate duce la modificări profunde. În anemia cu hematii falciforme, aceste modificări pot decide între viaţă şi moarte. Totuşi, după cum vom vedea mai tîrziu, se pare că numai unii aminoacizi din secvenţă au o asemenea importanţă. Este probabil că alţii pot fi schimbaţi fără consecinţe asupra funcţiei proteinei.

Scanned with OKEN Scanner

În al doilea rînd, se poate constata că secvența exactă a aminoacizilor în proteină poate fi determinată genetic. La homozigoții ce prezintă forma de drepanocitoză-boală se formează numai proteină anormală, pe cînd la heterozigoții cu drepanocitoză-tară se sintetizează atît proteina normală, cît și cea anormală ; la indivizii normali, hemoglobina din hematiile falciforme nu există. În condiții de heterozigotism, genele de origine maternă controlează sinteza unei hemoglobine cu o anumită secvență, iar genele paterne pe a alteia, cu o secvență ușor modificată.

Se pare că aceste fapte pot fi cel mai bine explicate dacă se admite că materialul genetic conține informația exactă și specifică pentru secvența aminoacizilor din fiecare moleculă de hemoglobină ce se sintetizează. Se poate merge mai departe și postula că secvența bazelor din ADN al genei răspunzătoare de anemia cu hematii falciforme este alterată într-un singur punct, astfel încît este alterată și secvența corespunzătoare de aminoacizi. La heterozigoții cu drepanocitoză-tară nici una dintre gene nu este dominantă, formîndu-se ca atare atît HbA, cît și HbS, prima sintetizîndu-se cu o viteză ceva mai mare, dat fiind că proporția dintre cele două proteine este de 60/40.

DISTRIBUȚIA GEOGRAFICĂ A GENEI CARACTERULUI FALCIFORM

În cele de mai sus s-a menționat că incidența indivizilor cu hematii falciforme este mare în Africa centrală și de vest. Gena poate fi găsită și în alte părți ale globului (fig. 11.8). În unele teritorii restrînse din anumite regiuni ale Africii aproape 40% din populație poate prezenta drepanocitoză ; o incidență de 15% a caracterului falciform se întîlnește frecvent în alte teritorii. Aceasta este o situație surprinzătoare, deoarece înseamnă că se perpetuează o genă care, în condiții de homozigotism, reprezintă un dezavantaj atît de marcat, încît o persoană în această situație nu supraviețuiește decît rareori pînă la vîrsta reproducerii. Se poate exclude rolul mutației continue ca factor răspunzător de această situație, deoarece o frecvență de mutație atît de mare, încît să mențină o incidență de 15% într-o populație este imposibilă. Prin urmare, trebuie să ne întrebăm care este avantajul selectiv pentru heterozigoți care să poată contrabalansa dezavantajul maxim al homozigotului. Allison a făcut o re-

Scanned with OKEN Scanner

marcă deosebit de interesantă : la indivizii cu drepanocitoză-tară incidenţa malariei este mai mică decît la cei cu hemoglobină normală. Această stare de lucruri ar explica distribuţia geografică a acestei anomalii, deoarece ariile de răspîndire a drepanocitozei

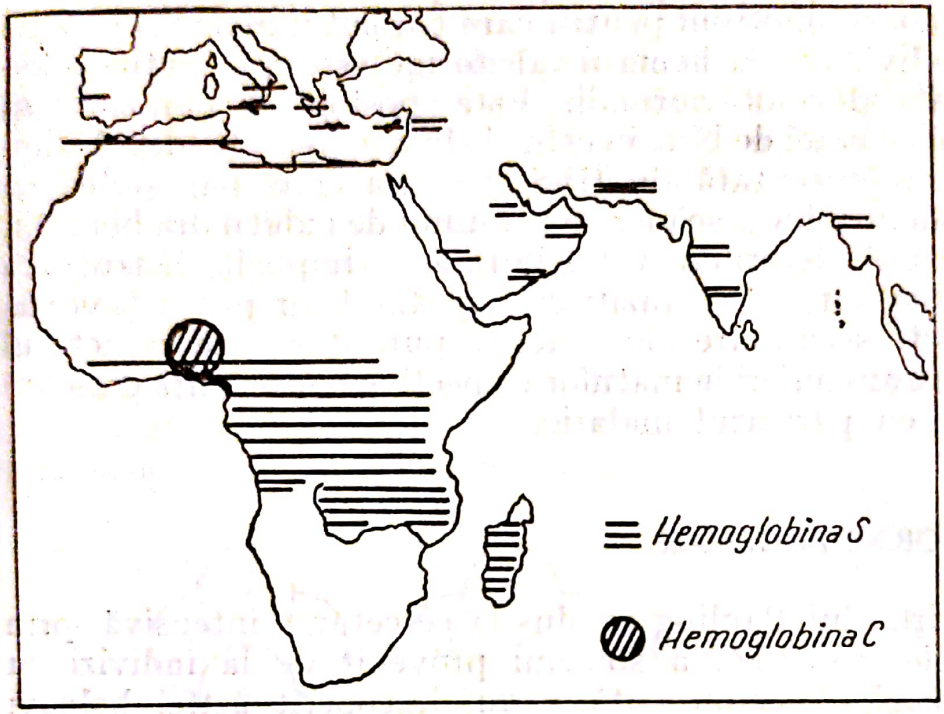


Fig. 11.8. Hartă indicînd zonele de mare incidenţă ale HbS şi HbC (după Lehman, 1959).

sînt situate în zonele paludice ale lumii sau în cele care pînă de curînd au fost impaludate. Pare bine demonstrat faptul că formele severe de malarie, ca malaria cerebrală, nu apar la indivizii cu drepanocitoză-tară cu aceeaşi frecvenţă cu care apar la indivizii normali din populaţia respectivă. Mai mult decît atît, copiii cu tară falciformă sînt relativ rezistenţi la infestarea malarică primară cu *P. falciparum*. (Situaţia este mai puţin clară la adulţii la care s-a dezvoltat un grad de imunitate faţă de infestare.) Ne-am aştepta deci ca, după eradicarea malariei într-o anumită zonă, gena care determină caracterul falciform să ajungă să reprezinte un dezavantaj selectiv şi să tindă astfel spre dispariţie. Acest lucru s-ar putea produce, de exemplu, în Indiile de Vest şi în S.U.A. Este interesant de semnalat faptul că în timpul perioadei comerţului cu sclavi mulţi africani din actualul teritoriu al Ghanei, unde există o incidenţă mare a genei HbS şi o răspîndire endemică a drepanocitozei, au fost duşi în diferite zone ale Americii şi în regiunea Caraibilor. Printre descendenţii din Suriname ai acestora, incidenţa malariei este mare iar gena

Scanned with OKEN Scanner

HbS se întîlneşte frecvent. În schimb, în Curaçao, malaria este rară iar frecvenţa HbS în populaţie este scăzută — se pare deci că gena este pe cale de dispariţie. Faptul că în diferite zone ale globului gena se întîlneşte ceva mai frecvent la populaţia săracă ar putea fi, de asemenea, în corelaţie cu punctul de vedere expus.

Nu se cunoaşte motivul pentru care parazitul malariei găseşte că sîngele indivizilor cu hematii falciforme este mai puţin satisfăcător decît al celor normali. Este posibil ca parazitul să nu se multiplice la fel de bine în celulele în care o parte din hemoglobină este reprezentată de HbS, tot aşa cum s-ar putea ca parazitul să determine o scădere a presiunii de oxigen din hematii, provocînd astfel deformarea falciformă şi implicit distrugerea atît a hematiei, cît şi a parazitului; în sfîrşit, ar putea fi vorba de unele efecte secundare ale genei răspunzătoare de caracterul falciform, care ar conferi hematiilor respective o rezistenţă crescută la infestarea cu parazitul malaric.

ALTE HEMOGLOBINE ANORMALE

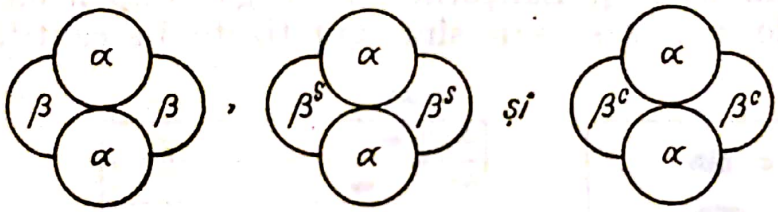
Descoperirile lui Pauling au dus la cercetarea intensivă, prin tehnici de electroforeză, a sîngelui provenit de la indivizi cu anemii de origine necunoscută. S-au descoperit astfel bolnavi care aparent aveau o anemie cu hematii falciforme (starea homozigotă), surprinzător fiind însă faptul că numai unul dintre părinţii lor poseda hematii cu această deformare. Hemoglobina acestor indivizi aparent homozigoţi prezenta o imagine electroforetică neobişnuită: aproximativ jumătate migra întocmai ca HbS, în timp ce restul se deplasa spre catod mai repede ca HbS. Prin urmare erau prezente două hemoglobine: HbS — care determină deformarea falciformă a hematiilor şi o a doua, denumită astăzi HbC, care migrează mai rapid. Starea caracterizată prin apariţia HbC a fost găsită şi în forma ei homozigotă. Este însă interesant de semnalat faptul că nu s-a depistat nici un caz în care să coexiste în sîngele unui singur individ toate cele trei tipuri de hemoglobină, HbS, HbC şi HbA. Genele care guvernează sinteza acestor proteine par să fie alele şi ca atare la un acelaşi individ nu pot exista decît două forme, cîte una provenită de la fiecare părinte.

Precizarea locului anomaliei moleculare în structura HbC era, evident, de o importanţă deosebită. Această problemă a

Scanned with OKEN Scanner

fost cercetată de Ingram, iar aspectele amprentelor obținute cu HbC sînt prezentate în fig. 11.7*b*. În locul peptidului 4 se observă acum doi peptizi; poziția din structura primară în care se găsea, în HbA, acidul glutamic, iar în HbS valina este ocupată în HbC de lizină. Datorită faptului că tripsina scindează legăturile lizinei, în imaginea care se obține cu ajutorul tehnicii amprentelor apar doi peptizi. Pe de altă parte, faptul că în HbS acidul glutamic este înlocuit prin valină, lipsită de sarcină liberă, iar în HbC prin lizina încărcată pozitiv explică de ce HbC migrează mai departe spre catod în cursul electroforezei. În boala cu HbC, ADN pare a fi modificat în aceeași porțiune restrînsă ca și în cazul producerii de HbS, dar într-un mod diferit, întrucît determină formarea unor proteine modificate în același punct.

Înlocuirile de aminoacizi din HbS și HbC afectează subunitățile β ale moleculei de hemoglobină. HbA, HbS și HbC pot fi schematizate, prin urmare, astfel:



sau $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\beta_2^S$ și $\alpha_2\beta_2^C$. După o ipoteză a lui Mourant, ar fi posibil ca HbC să fie produsul unei mutații ce afectează HbS, și nu HbA.

Nu toate anomaliile moleculei de hemoglobină sînt însoțite de stări patologice. Astfel, într-o altă hemoglobină anormală ce nu se manifestă clinic, modificarea este localizată tot în subunitatea β și tot în peptidul 4; de data aceasta însă este afectat aminoacidul numărul 8, în timp ce cel din poziția 7 este nemodificat. În hemoglobina normală, aminoacidul 8 din acest peptid este totdeauna acidul glutamic, în timp ce în această hemoglobină anormală el este înlocuit cu glicină.

În prezent se cunosc multe alte hemoglobine anormale, în care „leziunea" se găsește în alte puncte ale lanțului β sau în lanțul α (tabelul 11.1). (Întrucît fiecare subunitate conține un singur lanț peptidic, se poate utiliza aceeași denumire atît pentru lanțuri, cît și pentru subunități.) Atwater, precum și Baglioni

Scanned with OKEN Scanner

și Ingram au descris un caz în care erau prezente în sînge patru hemoglobine: $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2^G\beta_2$, $\alpha_2\beta_2^C$ și $\alpha_2^G\beta_2^C$; existau deci două lanțuri diferite α și două lanțuri diferite β. Prin urmare, la acest pacient atît genele α, cît și genele β moștenite de la tată erau diferite de cele moștenite de la mamă. Funcția tuturor celor patru gene era deplin exprimată, deoarece toate cele patru hemoglobine se găseau în sînge în aproximativ aceeași concentrație. Aceste cercetări au arătat că genele care determină secvențele din lanțurile α și β segregă independent. Pare deci foarte puțin probabil ca cele două gene să ocupe poziții adiacente pe un același cromozom și este posibil ca ele să se afle în cromozomi diferiți.

În afecțiunea caracterizată prin prezența hemoglobinei anormale HbH pare să existe o incapacitate totală de sintetizare a lanțului α. În schimb lanțurile β sînt sintetizate practic normal și formează dimeri, ca în orice moleculă de hemoglobină. În lipsa lanțurilor α, unirea lanțurilor β dă naștere unei hemoglobine a cărei formulă este β_4. Lanțurile β se leagă în acest mod numai cînd lanțurile α lipsesc sau sînt sintetizate în cantități mici.

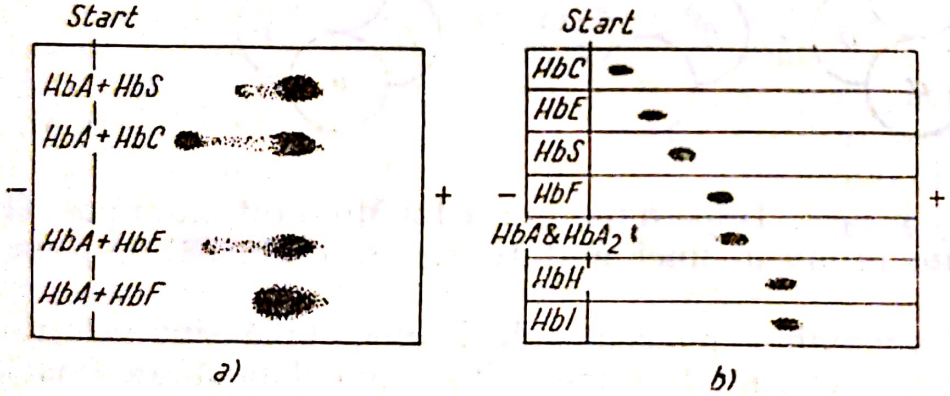


Fig. 11.9. Electroforeză pe hîrtie de filtru a unor hemoglobine.

Diferitele hemoglobine incluse în această figură (HbA, HbC, HbE etc.) sînt descrise în cuprinsul capitolului de față sau în tabelul 11.1. În aceste separări electroforetice, la pH 8,6, toate hemoglobinele poartă o sarcină liberă negativă. Hemoglobinele cu o sarcină liberă mai mare se deplasează mai departe spre dreapta în cursul separării. Punctul de plecare este marcat în partea stîngă a fiecărei diagrame. Desenul din stînga (*a*) arată rezultatele reale obținute cu unele din diversele hemoglobine (modificat după Huisman, 1959). Schema din dreapta (*b*) indică într-un mod mai clar deosebirile de mobilitate.

În fig. 11.9 sînt reprezentate aspectele de separare electroforetică a cîtorva din hemoglobinele anormale descrise; în realitate, se cunosc mult mai multe (tabelul 11.1). Foarte probabil că există și hemoglobine anormale care n-au fost încă descoperite. Dacă schimbarea secvenței de aminoacizi, rezultată

Scanned with OKEN Scanner

în urma unei mutaţii, constă în înlocuirea unui rest de aminoacid printr-un altul avînd aceeaşi încărcătură electrică, comportarea electroforetică a moleculei va rămîne nemodificată. Este posibil ca modificarea să nu producă nici tulburări clinice şi ca tehnicile curente de laborator să nu poată diferenţia această hemoglobină anormală de HbA. Mutaţia va rămîne deci „mută" şi nedescoperită.

HEMOGLOBINELE ÎN CURSUL DEZVOLTĂRII INDIVIDULUI

Încă din 1866 s-a constatat că sîngele copiilor nou-născuţi conţine o hemoglobină mai rezistentă la denaturare cu acizi sau alcali decît cea a adultului. Există şi alte deosebiri între hemoglobina fetală şi cea a adultului, cea mai importantă dintre ele din punct de vedere fiziologic constînd în afinităţile lor diferite faţă de oxigen. Existenţa unor pigmenţi respiratori cu o mare afinitate pentru oxigen a fost pusă în evidenţă şi la numeroase alte animale vertebrate şi nevertebrate în cursul dezvoltării embrionare şi fetale, cînd există o anoxie relativă. Acest lucru

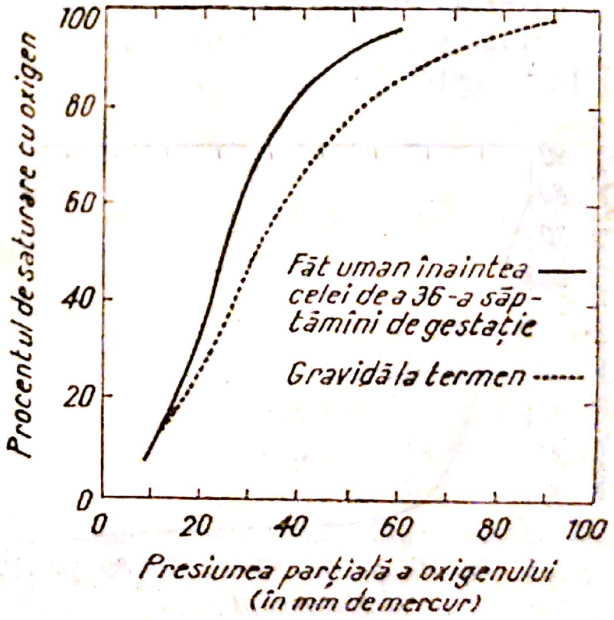


Fig. 11.10. Curbe de disociere a oxigenului în sîngele uman fetal şi matern (modificat după Walker şi Turnbull, 1955).

se referă îndeosebi la organismele cu dezvoltare placentară, dintre care, după cum se ştie, face parte şi omul. Din curbele de disociere a oxigenului caracteristice sîngelui uman de la făt şi de la adult (fig. 11.10) se poate vedea că la toate valorile presi-

Scanned with OKEN Scanner

unii parţiale de oxigen, sîngele fetal fixează mai mult oxigen decît cel al adultului. Aceasta favorizează transferul oxigenului de la hemoglobina maternă la cea fetală. (Mioglobina are şi ea o afinitate mai mare pentru oxigen decît HbA şi poate contribui la transferul oxigenului către muşchi.)

Înlocuirea hemoglobinei fetale prin hemoglobina de adult a fost studiată cel mai mult la mamifere şi în mod special la om. La naştere, concentraţia hemoglobinei fetale (HbF) cu afinitate mare pentru oxigen este de aproximativ 80%; în cursul următoarelor săptămîni ea scade destul de rapid (fig. 11.11) şi, în schimb, creşte în mod corespunzător nivelul HbA. S-a emis ipoteza că ceea ce stimulează această înlocuire ar fi presiunea parţială de oxigen, diferită în cazul fătului şi al copilului. În realitate, situaţia pare să fie însă mai complicată. HbA a fost detectată foarte timpuriu în cursul vieţii intrauterine: un cercetător semnalează apariţia HbA în a 13-a săptămînă; la naştere ea se găseşte în proporţie de circa 20%. În cursul stadiilor avansate ale vieţii intrauterine cantitatea de oxigen furnizată ţesutului hematopoetic fetal este mică şi, cu toate acestea, sinteza de HbA este în creştere în cursul acestei perioade.

Producerea de HbF continuă de regulă în perioada postnatală, dar la vîrsta de aproximativ patru luni aproape toată hemoglobina este de tip adult; în cursul vieţii adulte nu se găsesc

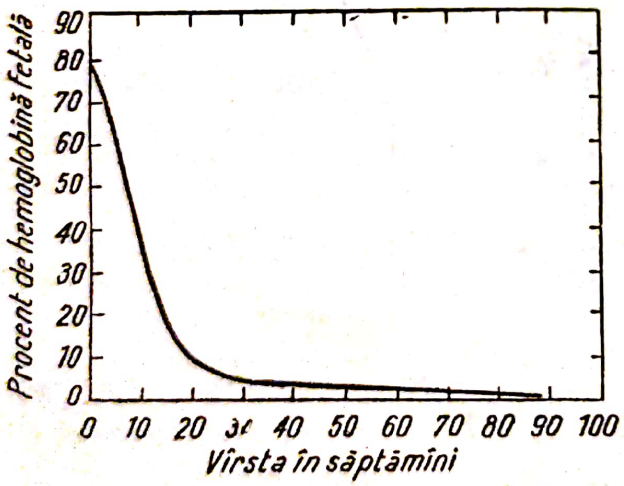


Fig. 11.11. Dispariţia hemoglobinei fetale din sîngele copilului în săptămînile de după naştere (modificat după Jonxis, 1959).

de regulă în sînge decît urme de HbF. Mai mult, o dată pierdută sau redusă la valori minime, capacitatea de a sintetiza HbF nu mai poate fi recuperată. Este demn de amintit faptul că la indivizii crescuţi încă de la naştere la presiuni parţiale de oxigen

Scanned with OKEN Scanner

scăzute, cum sînt, de exemplu, şerpaşii şi indienii din Peru, trecerea de la HbF la HbA se produce totuşi în condiţii normale. Nu este încă stabilit cu certitudine dacă în cursul perioadei de tranziţie HbF şi HbA coexistă în acelaşi globul roşu. S-ar putea să existe două tipuri distincte de populaţii celulare, sau ar fi posibil ca celulele care produc în viaţa intrauterină HbF să treacă, în cursul perioadei postnatale, la producerea de HbA.

Dispunem astăzi de o serie de date care arată că în cursul primului stadiu de dezvoltare embrionară a omului (aproximativ la 13 săptămîni) mai există, pe lîngă HbF, şi o altă hemoglobină. Cunoştinţele asupra acestei hemoglobine primitive sau embrionare sînt sumare, dar se ştie că şi la alte specii de mamifere există în cursul dezvoltării o succesiune asemănătoare de hemoglobine.

Hemoglobina sintetizată de către un făt care a moştenit starea homozigotă a caracterului falciform este o HbF normală. Studierea moleculelor disociate de HbA, HbS şi HbF a permis înţelegerea acestei situaţii. După cum s-a mai spus, la *p*H 3 HbA se scindează în α_2 şi β_2, în timp ce HbS se scindează în α_2 şi β_2^S. HbF conţine aceleaşi lanţuri α ca şi hemoglobina adultului, dar în locul dimerului β_2 există un alt dimer, deosebit din multe puncte de vedere atît de β_2, cît şi de β_2^S; acesta a fost denumit γ_2. Defectul genetic al bolii cu hematii falciforme iese la iveală abia cînd producţia de lanţuri γ lasă locul sintezei lanţurilor β, avînd în vedere că „leziunea" afectează numai sinteza acestor din urmă lanţuri, în sensul că se formează lanţuri β^S în locul celor normale β_2. După cum am văzut, lanţurile β ale hemoglobinei umane normale a adultului nu diferă de cele ale unor hemoglobine anormale, ca HbS şi HbC, decît printr-un singur rest de aminoacid. Lanţurile γ ale hemoglobinei fetale diferă într-o măsură mult mai mare; ele conţin, spre exemplu, 6 resturi de izoleucină, în timp ce în lanţurile α şi β nu poate fi găsit nici unul.

Tot aşa cum există mutaţii care afectează lanţurile β ale HbA şi dau naştere la hemoglobine anormale ca HbS, tot astfel există mutaţii care afectează lanţul γ şi generează hemoglobine fetale anormale. Se cunoaşte, de asemenea, un caz cînd este complet reprimată sinteza lanţurilor α şi β, ceea ce are ca urmare unirea a doi dimeri γ. Este cazul Hb Bart, a cărei formulă poate fi scrisă γ_4.

Scanned with OKEN Scanner

COMPONENTE HEMOGLOBINICE MINORE

În 1955, Kunkel şi colaboratorii au observat că în sîngele adulţilor normali există o mică fracţiune de hemoglobină care migrează mai lent decît HbA la electroforeza în condiţii de *p*H alcalin (fig. 11.9 *b*). În sîngele normal această fracţiune minoră se găseşte într-o proporţie de aproximativ 2,5%. Analiza acestei hemoglobine, denumită în mod curent HbA_2, a arătat că lanţul α este identic cu cel existent în componenta normală majoră, dar că în această hemoglobină se găseşte în schimb o formă modificată a lanţului β. Aceste lanţuri modificate au fost denumite lanţuri δ (tabelul 11.1).

Este interesant de menţionat că în boala cu HbG, în care se întîlneşte o componentă majoră de $\alpha_2^G\beta_2$, componenta minoră este $\alpha_2^G\delta_2$, care se deosebeşte electroforetic de HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$). Există de asemenea variante de HbA_2 în care lanţul δ a suferit o mutaţie similară cu mutaţiile pe care le-am întîlnit la lanţurile α, β şi γ (tabelul 11.1).

EVOLUŢIA MOLECULARĂ A HEMOGLOBINELOR

Putem trece acum la descrierea sintezei hemoglobinei, dat fiind că, deşi datele cunoscute asupra acestei probleme sînt încă departe de a fi certe, ele concordă în largă măsură cu descoperirile redate în capitolul de faţă şi în alte capitole ale acestei cărţi.

Secvenţa exactă a aminoacizilor ce se găsesc în lanţurile α ale hemoglobinei umane este determinată de o secvenţă precisă de baze dintr-o anumită moleculă de ADN. După cum se va arăta în cap. 12, lanţurile se formează prin adăugarea de aminoacizi, unul cîte unul, pornind de la capătul N-terminal. La indivizii cu anomalii a avut loc o mutaţie care modifică secvenţa bazelor din ADN; în consecinţă se vor forma lanţuri a căror secvenţă de aminoacizi este modificată într-un anumit punct. Lanţurile α, normale sau anormale, sînt produse în cursul vieţii intrauterine şi sînt sintetizate în continuare şi în organismul adult.

La făt, o altă secvenţă de ADN determină sinteza unui lanţ diferit, lanţul γ. În mod normal, în cursul vieţii intrauterine

Scanned with OKEN Scanner

lanţurile α şi γ sînt sintetizate concomitent şi se combină cîte patru pentru a da naştere hemoglobinei $\alpha_2 \gamma_2$, care este hemoglobina fetală. Curînd după naştere este suprimată activitatea secvenţei de baze din ADN care guvernează formarea lanţurilor γ, devenind în schimb activă o altă secvenţă de baze ce se exprimă prin sinteza de lanţuri β. Lanţurile α se combină cu lanţurile β pentru a forma hemoglobina de tip adult $\alpha_2\beta_2$. O altă secvenţă de baze din ADN determină ordinea aminoacizilor din lanţurile δ, care se combină şi ele cu lanţuri α pentru a forma hemoglobina $\alpha_2\delta_2$. Această din urmă hemoglobină este sintetizată în cantităţi mai mici şi, prin urmare, în sîngele adulţilor normali ea există doar ca o componentă minoră. Aşadar sinteza fiecăruia dintre lanţurile α, β, γ sau δ este controlată de o secvenţă diferită de baze din ADN (adică de cistroni diferiţi) şi fiecare poate fi afectat de alterări sau mutaţii ce duc la apariţia în aceste lanţuri a unor secvenţe anormale şi deci la formarea unor hemoglobine anormale.

Cum pot fi integrate aceste date în complexul cunoştinţelor noastre asupra evoluţiei? Urmărind evoluţia unei structuri, căutăm să stabilim asemănări şi analogii ; acelaşi lucru se aplică şi la nivel molecular. Este evident că apariţia HbS pare să fie urmarea unui singur eveniment mutaţional afectînd HbA, întrucît pentru a modifica un singur aminoacid din lanţul β nu este necesară decît o alterare discretă a secvenţei de baze din ADN.

Este oare posibil ca genele care controlează sinteza lanţurilor peptidice α, β, γ din molecula de hemoglobină, sau a altora să fi apărut dintr-un ADN comun? Ce asemănări există între secvenţele de aminoacizi ale lanţurilor α, β şi γ? În tabelul 11.1 sînt reproduse secvenţele de aminoacizi aşa cum au fost determinate în lanţurile α şi β, precum şi în cele de mioglobină (în porţiunile încadrate ordinea nu este încă certă). Pentru a se putea aşeza alături regiunile similare ale diferitelor lanţuri, în anumite locuri au fost omise porţiuni cuprinzînd pînă la şase aminoacizi (spre exemplu, în lanţul α aminoacizii de la numărul 53 la 58). Deoarece aceste secvenţe au fost determinate pe hemoglobina umană iar cercetările cu raze X expuse în cap. 3 au fost efectuate pe hemoglobina de cal, unele date privitoare la relaţia dintre structura primară şi cea terţiară nu sînt încă certe. Examinarea atentă a modelului din fig. 3.13 a arătat totuşi că la hemoglobina de cal, în zona corespunzătoare aminoacizilor 42—59, lanţul α este mai scurt decît lanţul β, diferenţă ce putea fi

Scanned with OKEN Scanner

prevăzută pe baza comparării secvenţelor din cele două lanţuri ale hemoglobinei umane.

Din datele prezentate în tabelul 11.1 trebuie trasă concluzia că în aceste proteine se pot produce înlocuiri ale unui număr destul de mare de aminoacizi cu alţii, fără ca aceasta să influenţeze prea mult structura terţiară. Acest lucru este valabil deopotrivă pentru lanţurile α şi β ale hemoglobinei şi pentru cel al mioglobinei (cap. 3). Observaţia amintită are implicaţii genetice, deoarece ea sugerează că, atît în cazul hemoglobinei, cît şi în cel al altor proteine, multe mutaţii pot fi detectate numai în urma unei cercetări amănunţite a structurii primare a proteinei afectate. Este posibil ca funcţia unei proteine să nu fie modificată sau pierdută decît atunci cînd modificările interesează anumiţi aminoacizi cheie, acestea fiind singurele cazuri în care apar şi schimbări fenotipice detectabile prin mijloace mai puţin precise.

Deşi nu putem exclude posibilitatea ca lanţurile de hemoglobină şi mioglobină să fi apărut independent, pare mai raţional, date fiind însuşirile lor asemănătoare, să presupunem că ele derivă dintr-o formă comună prin divergenţă decît să ne gîndim la un proces convergent. Forma comună primordială ar fi putut fi o proteină alcătuită dintr-o singură unitate, asemănătoare cu mioglobina. Hemoglobina care se găseşte la unul din vertebratele inferioare (ciclostomul *Lampetra*) este alcătuită dintr-o singură unitate cu o grupare hemică unică. În moleculele formate din patru subunităţi, interacţiunea dintre grupările hemice conferă avantaje fiziologice ca urmare a efectelor pe care le are asupra curbelor de fixare a oxigenului. Geneticianul cunoaşte mecanisme prin care o aceeaşi garnitură de cromozomi poate ajunge să conţină în mod permanent două sau mai multe „versiuni" ale unei aceleiaşi gene ancestrale. Aceste mecanisme au la bază, în prima fază, o meioză anormală în cursul căreia are loc o duplicare longitudinală a unui segment cromozomial. Ulterior, aceste două copii ale genei care s-a duplicat pot evolua separat.

Evoluţia a făcut ca peptizii hemoglobinei şi mioglobinei să fie mult mai deosebiţi între ei decît moleculele de insulină ale diverselor specii (fig. 3.4) ; explicaţia ar putea fi aceea că în cazul insulinei o alterare a secvenţei duce mai rapid la pierderea activităţii. Aşteptăm cu mult interes viitoarele descrieri ale unor

Scanned with OKEN Scanner

asemănări dintre subunităţile de hemoglobină provenite de la specii diferite. Hemoglobinele gorilei şi cimpanzeului dau amprente similare cu cele ale hemoglobinei umane ; cele obţinute cu hemoglobina de la maimuţele *Rhesus* sînt simţitor diferite. Asemenea date vor aduce noi contribuţii în sistematică şi vor da naştere unei noi metode de cercetare a evoluţiei, bazată nu pe elemente grosolane de structură, ci pe decelarea unor deosebiri între proteine — împinsă pînă la nivelul de maximă fineţe — şi, implicit, pe deducerea deosebirilor în structura moleculară a ADN ce constituie materialul genetic moştenit.

74—8

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 12

SINTEZA PROTEICĂ

În capitolele anterioare am discutat rolurile importante, funcţionale şi structurale, pe care le au proteinele în celule şi am văzut că proprietăţile unei proteine date sînt determinate de diversitatea şi secvenţa aminoacizilor în lanţurile peptidice care o alcătuiesc. Sinteza proteinelor constituie deci una din activităţile cruciale ale materiei vii şi ea presupune asamblarea aminoacizilor în secvenţe specifice. Pînă de curînd, cunoştinţele asupra acestui proces erau foarte sărace.

În trecut au existat două feluri de teorii asupra sintezei proteice. Unele postulau că, în anumite condiţii, reacţiile enzimatice care duc la scindarea proteinelor s-ar putea inversa şi că, astfel, aceleaşi enzime ar putea avea şi rolul de a sintetiza proteinele, pornind fie de la aminoacizi individuali, fie de la peptide scurte. Această ipoteză se baza pe unele cercetări biochimice în cadrul cărora se reuşise legarea laolaltă a unui număr redus de aminoacizi prin reacţii chimice de condensare, obţinîndu-se astfel lanţuri peptidice scurte. Se credea astfel că ar fi posibil ca, prin asamblarea unor fragmente proteice din ce în ce mai complexe, să se obţină lanţuri peptidice lungi, proprietăţile acestora fiind apoi modificate enzimatic prin înlocuirea sau adăugarea de aminoacizi, pînă ce se ajunge la proteina dorită.

Deşi, cum s-a dovedit ulterior, aceste experienţe nu au elucidat problema sintezei proteice *in vivo*, ele au scos în evidenţă una din dificultăţile majore în calea formării legăturilor dintre aminoacizi : asigurarea energiei chimice necesare acestei reacţii. Astfel, pentru formarea unei legături între doi aminoacizi sînt necesare aproximativ 4 kcal/mol şi, cu toate că pentru unirea unor lanţuri peptidice mai lungi această valoare este mai mică, nevoile

Scanned with OKEN Scanner

energetice continuă să reprezinte una din principalele dificultăţi ce se ridică în calea înţelegerii sintezei peptidice. După cum era de aşteptat pe baza acestor constatări, s-a descoperit curînd că în celulă sinteza proteică este strîns legată de sistemele producătoare de energie şi că, spre exemplu, ea încetează în prezenţa unor substanţe toxice cum ar fi cianurile, care blochează aceste sisteme. Ulterior, s-a dovedit că ATP şi alţi cofactori joacă un rol esenţial în procesele de sinteză şi că ATP se află în strînsă corelaţie cu primele stadii ale sintezei proteice.

Teoriile din cea de a doua categorie urmăreau să găsească cheia cu ajutorul căreia să se poată explica modul în care este determinată ordinea, sau secvenţa, aminoacizilor din lanţul de proteină în cursul sintezei acestuia. Teoria iniţială a „matricei" elaborată de Pauling şi Haurowitz postula că pentru fiecare proteină ar exista, probabil în cromozom, o matrice sau copie a ei înseşi, sub forma unui lanţ peptidic desfăşurat. S-a presupus că pe această matrice ar fi dispuse o serie de zone care, printr-un proces asemănător cristalizării, ar permite condensarea aminoacizilor din mediul înconjurător pe aminoacidul corespunzător din matrice. Fiecare aminoacid s-ar aşeza astfel într-o poziţie corectă în cadrul şirului respectiv, nemairămînînd decît ca o enzimă să-l lege de vecinii săi, dînd naştere unui lanţ peptidic identic în toate privinţele cu matricea. Ulterior, probabil sub acţiunea unei alte enzime, s-ar produce îndepărtarea de pe matrice a lanţului care, astfel, se va putea înfăşura, îmbrăcînd forma unei proteine specifice.

Ipoteza matricei a fost concepută într-o vreme cînd majoritatea biologilor credeau că, din toţi constituenţii celulari, numai proteinele au proprietăţi de asemenea natură încît să le confere o plasticitate suficientă pentru a acţiona ca gene şi a controla în consecinţă enorma complexitate a celulei vii. În acel moment nu s-a putut aduce nici o probă în sprijinul existenţei unei astfel de matrice sau a unor enzime corespunzătoare. A devenit de asemenea limpede că, prin forma lor, grupările catenelor laterale ale proteinelor nu pot constitui locuri care să determine legarea de ele a aminoacizilor. Această obiecţie putea fi învinsă, în principiu, prin introducerea în această teorie a unor elemente de mai mare fineţe. S-a emis supoziţia că acizii nucleici sau alte molecule ar putea adopta o configuraţie complementară în raport cu cea a matricei, întocmai ca un mulaj. Ulterior, mulajul s-ar desprinde

Scanned with OKEN Scanner

de pe matrice, expunînd astfel un şir de locuri libere în care să se lege noi aminoacizi, lanţul peptidic astfel format fiind identic cu matricea originară.

Toate aceste speculaţii au trebuit să fie abandonate în cele din urmă, deoarece metode şi tehnici noi au scos la iveală anumite fapte pe baza cărora s-a elaborat o explicaţie mult mai satisfăcătoare a proceselor de sinteză proteică. Cu toate acestea însă, în cunoştinţele noastre mai persistă şi astăzi lacune importante, şi este sigur că în acest domeniu vor mai surveni atît modificări de amănunt, cît şi remanieri ale vederilor de ansamblu.

TEHNICILE MODERNE DE CERCETARE A SINTEZEI PROTEICE

O parte din tehnicile care au stat la baza acestor progrese recente au fost descrise, în linii generale, în cap. 2; este totuşi necesar ca unele dintre ele să fie reexaminate mai amănunţit în contextul capitolului de faţă. Dintre aceste tehnici, cea mai importantă este utilizarea izotopilor radioactivi. Aminoacizi marcaţi cu ^{55}S, ^{14}C sau ^{3}H pot fi întrebuinţaţi ca precursori în sinteza proteinelor şi, mînuiţi cu pricepere, ei ne pot arăta unde şi cînd este încorporat aminoacidul în proteină. În acelaşi timp, ei ne pot informa dacă înainte sau în cursul încorporării aminoacidul este legat de alte substanţe sau structuri. Trebuie să ne asigurăm că, în celulă, aminoacidul marcat nu este transformat într-un alt produs, care să se lege ulterior, ca atare, de proteine. Pentru a dovedi că în cursul unei experienţe s-a produs o sinteză de proteine, trebuie demonstrat că aminoacidul a fost efectiv încorporat în proteină prin intermediul unor legături peptidice corecte şi nu numai la unul dintre capetele lanţului peptidic, dar şi în mijlocul acestuia.

Pe scurt, metoda constă fie în hrănirea unui animal cu o soluţie de precursori radioactivi, fie în punerea în contact, pe un timp determinat, a celulelor (sau a componentelor ei) cu o soluţie care conţine aminoacidul radioactiv. Celulele sînt apoi prelevate de la animal sau scoase din cultură şi spălate pentru îndepărtarea excesului de radioactivitate. Se izolează apoi diferiţii

Scanned with OKEN Scanner

constituenţi celulari şi se precizează localizarea aminoacizilor marcaţi, prin măsurarea radioactivităţii fiecărei fracţiuni cu un contor adecvat.

Paralel cu progresele făcute prin utilizarea izotopilor radioactivi s-a perfecţionat şi tehnica de separare a constituenţilor celulari şi de analizare a structurii lor chimice (cap. 2). Cele mai importante realizări s-au obţinut în tehnica centrifugării; s-a reuşit astfel fabricarea unor aparate simple capabile să dezvolte o mare forţă centrifugă (100 000 *g* se realizează în mod curent, dar se poate atinge şi dublul); mai mult decît atît, construirea unui instrument special, denumit centrifugă analitică, a dat biochimiştilor posibilitatea să efectueze studii şi determinări asupra moleculelor mari şi structurilor biologice chiar în cursul centrifugării acestora. Aceasta se realizează printr-un dispozitiv cu lentile şi oglinzi care luminează recipientul de centrifugare în cursul rotirii acestuia, proiectînd pe un ecran sau pe o placă fotografică imaginea mărită a soluţiei, în cursul fiecărei mişcări de revoluţie. Imaginea poate fi obţinută astfel încît să ne indice fie concentraţia substanţelor care absorb razele ultraviolete, cum sînt acizii nucleici, fie concentraţia întregului material. În acest mod se poate studia deplasarea în cursul centrifugării a fracţiunilor cu coeficienţi de sedimentare diferiţi. Particulele care sedimentează cu viteze diferite pot fi astfel identificate şi caracterizate.

Din punctul de vedere al sintezei proteice, s-au dovedit a fi deosebit de importante două fracţiuni, care rămîn în suspensie după sedimentarea nucleelor, mitocondriilor şi membranelor celulare într-un cîmp centrifugal de la 10 000 pînă la 20 000 *g*. Dacă, după această primă separare, se centrifughează din nou supernatantul la 100 000 *g*, la fundul tubului se formează un depozit gelatinos care conţine ribozomi şi restul de reticul endoplasmic. Supernatantul limpede care rezultă după această a doua centrifugare mai conţine încă, după cum vom vedea, numeroase alte substanţe care au un rol important în sinteza proteinelor.

La progresele datorite celor două tehnici descrise s-au adăugat apoi altele, de mare fineţe, bazate pe îmbogăţirea cunoştinţelor noastre asupra mediului chimic intern al celulei. Pentru biochimist s-a dovedit deosebit de importantă posibilitatea urmăririi diferitelor reacţii în condiţiile unei independenţe cît mai avansate de variabilele mediului biologic. Din acest punct de vedere, un organ izolat, de exemplu ficatul, este de preferat

Scanned with OKEN Scanner

animalului întreg, o clonă de celule este mai avantajoasă decît ficatul, iar un preparat pur de nuclee sau mitocondrii este superior amîndurora.

În cursul cercetărilor mai vechi de biochimie, s-a descoperit că într-un fragment de organ, spre exemplu de ficat, se pot desfășura pentru o perioadă de timp multe din funcțiile metabolice ale ficatului întreg. Recent, s-au pus la punct soluții de incubare care permit componentelor celulare să-și păstreze cel puțin o parte din activitatea lor metabolică, chiar și după disruperea celulei și separarea diferitelor fracțiuni. Pe măsura simplificării sistemelor biologice de studiu, a devenit necesară o selecționare din ce în ce mai pretențioasă a ingredientelor care urmează a fi adăugate în mediul de incubație, pentru a face posibilă desfășurarea reacțiilor biochimice. În general, îmbogățirea simțitoare a cunoștințelor noastre asupra sintezei proteinelor se datorește posibilității de a izola componentele celulare esențiale pentru sinteza proteică și identificării ionilor, ATP, enzimelor etc. care sînt necesare pentru a se realiza încorporarea aminoacizilor *in vitro*.

COMPONENTELE CELULARE ESENȚIALE PENTRU SINTEZA PROTEICĂ

În perioada 1935—1941 a devenit posibil să se cerceteze modul de distribuire a acizilor nucleici în diferitele tipuri de celule. Cercetările inițiale au fost efectuate de două grupuri de cercetători. La Stockholm, Caspersson și colaboratorii săi au pus la punct o adaptare a tehnicii microscopice ce permitea urmărirea absorbției razelor ultraviolete cu diferite lungimi de undă și să determine în acest mod distribuția acizilor nucleici în cromozomi, în nucleoli și în citoplasma celulelor. Aproape în aceeași perioadă, Brachet, la Bruxelles, a utilizat pentru detectarea și identificarea acizilor nucleici din preparatele sale tehnici de colorare combinate cu tratamente enzimatice specifice. Una dintre concluziile cele mai interesante și semnificative ale acestor cercetări inițiale a fost aceea că toate celulele în care se desfășoară o sinteză proteică intensă, fie că sînt în faza de creștere

Scanned with OKEN Scanner

rapidă, fie că secretă enzime, conţin o cantitate sporită de acid nucleic citoplasmatic (ARN) în comparaţie cu celulele mai puţin active. Cu toate acestea, abia mult mai tîrziu a devenit evident că ARN nu numai că participă la sinteza proteică, ci este chiar esenţial pentru acest proces.

Acest fapt a fost dovedit pentru prima dată de lucrările efectuate de Gale la Cambridge şi de Zamecnik şi colaboratorii săi la Boston. Aceştia din urmă au publicat o serie de articole remarcabile în care au lămurit, pas cu pas, diversele trepte ale sintezei proteinelor, la care participă ARN. Prima experienţă importantă a acestor autori a constat în injectarea unor şobolani cu leucină radioactivă, după care animalelor li s-au excizat lobii hepatici, unul cîte unul, la 5, 12 şi 20 de minute. Celulele fiecărui lob în parte au fost omogenizate, iar nucleele, membranele celulare externe şi mitocondriile au fost sedimentate prin centrifugare la 18 000 *g*. Supernatantul a fost centrifugat din nou la 100 000 *g* pentru a se obţine fracţiunea microzomală, care conţinea majoritatea ARN din celulă. Sedimentul a fost fracţionat apoi mai departe prin tratare cu dezoxicolat, care solubilizează membranele microzomale, obţinîndu-se o fracţiune ribozomală şi o fracţiune dezoxicolat-solubilă ce conţinea proteina nou formată. Autorii au constatat că în lobul excizat la 5 minute după administrarea leucinei marcate, cea mai mare parte a radioactivităţii se regăsea în ribozomi, pentru ca, ulterior, să crească progresiv radioactivitatea proteinei solubile. Mai interesantă era constatarea că, în lobii excizaţi mai tîrziu, radioactivitatea ribozomilor era în descreştere. Aceasta însemna că încorporarea aminoacizilor în proteină trebuie să se producă iniţial la nivelul ribozomului şi că abia după aceasta ei pot fi regăsiţi în proteinele solubile; rezulta deci că ribozomul participă în mod cert la sinteza proteinelor.

Aceste cercetări au fost ulterior mult extinse, prin modificarea modelului experimental. Celulele hepatice au fost în prealabil disrupte şi separate în diferitele fracţiuni componente, pentru ca apoi toate sau o parte din aceste fracţiuni să fie incubate în prezenţa precursorului marcat. Deşi în aceste modele ritmul de încorporare a substanţei radioactive este de cel puţin zece ori mai mic, decît atunci cînd se lucrează cu celule intacte, metoda este mult mai precisă, deoarece permite cercetarea, în condiţii riguros definite, a efectelor prezenţei sau absenţei fie-

Scanned with OKEN Scanner

cărei fracţiuni. S-a stabilit astfel că principalii constituenţi celulari necesari pentru încorporarea în proteină a aminoacizilor marcaţi sînt următorii:

(i) fracţiunea microzomală;
(ii) fracţiunea din supernatant;
(iii) ATP;
(iv) un sistem biochimic pentru producerea unor noi cantităţi de ATP.

În lipsa oricăruia dintre aceşti constituenţi, încorporarea aminoacizilor nu se mai producea, fără ca adăugarea de mitocondrii sau de alte substanţe să crească ritmul de desfăşurare a acestui proces. Lista ingredientelor necesare a putut fi redusă şi mai mult prin utilizarea unor celule tumorale deoarece, spre deosebire de celulele hepatice, acestea nu dispun de un sistem de membrane interne şi conţin cantităţi mai mici de enzime care scindează ATP. În extractele preparate din aceste celule, singurele componente esenţiale erau:

(i) ribozomii;
(ii) fracţiunea din supernatant;
(iii) ATP.

LEGAREA AMINOACIZILOR DE MOLECULELE DE ARN DE TRANSFER

În continuarea experienţelor descrise mai sus, Zamecnik şi colaboratorii săi au cercetat mai în amănunt fracţiunea din supernatant şi au descoperit că aceasta conţine două componente majore: prima, de natură enzimatică, conţinea o serie de enzime diferite, fiecare dintre ele fiind capabilă să formeze un complex specific cu un anumit tip de aminoacid. Cea de a doua componentă era un ARN cu greutate moleculară mică, diferit prin compoziţia sa în baze de ARN din ribozomi (tabelul 9.2).

Scanned with OKEN Scanner

Enzimele puse în evidenţă au mai multe proprietăţi interesante: ele sînt capabile să catalizeze o reacţie între ATP şi un aminoacid, în urma căreia moleculele acestora sînt reunite într-o combinaţie adenil-aminoacid, o parte din energia chimică acumulată în ATP fiind transferată în cursul acestei reacţii asupra noului compus. Din punct de vedere energetic, aceasta este etapa crucială a sintezei proteice; o dată format, acest compus poate ceda energia la fiecare treaptă succesivă pînă se ajunge la formarea legăturii peptidice. Aceste enzime au primit de aceea denumirea de „enzime de activare". Toate etapele consecutive formării combinaţiei adenil-aminoacid au drept scop ordonarea aminoacizilor în vederea formării de proteine specifice. Enzima activatoare rămîne prinsă de complexul adenil-aminoacid şi multe din enzimele de activare legate de aminoacizii respectivi au fost obţinute într-o stare de înaltă puritate. Într-adevăr, este probabil că există cel puţin douăzeci de enzime diferite din această categorie, fiecare dintre ele fiind specifică pentru un anumit aminoacid.

Stadiul următor al sintezei proteice poate fi dedus din următoarea experienţă: dacă se incubează un amestec ce conţine:

(i) enzime activatoare;
(ii) ATP;
(iii) Mg^{++};
(iv) fracţiunea de ARN cu greutate moleculară mică descrisă mai sus;
(v) aminoacizi,

se produce legarea aminoacizilor de ARN prin legături covalente. Această legare este condiţionată de prezenţa enzimei activatoare respective, care intervine deci în două etape ale procesului: în primul rînd la formarea aminoacidului activat şi apoi la transferul acestuia pe ARN cu greutate moleculară mică.

Putem face acum o nouă experienţă. ARN cu greutate moleculară mică, de care sînt legaţi aminoacizi marcaţi, poate fi izolat din amestecul aflat la incubare prin tratare cu fenol. Dacă se incubează aceste complexe purificate ARN-aminoacid împreună cu:

(i) microzomi;
(ii) ATP şi un sistem generator de ATP;
(iii) Mg^{++};

Scanned with OKEN Scanner

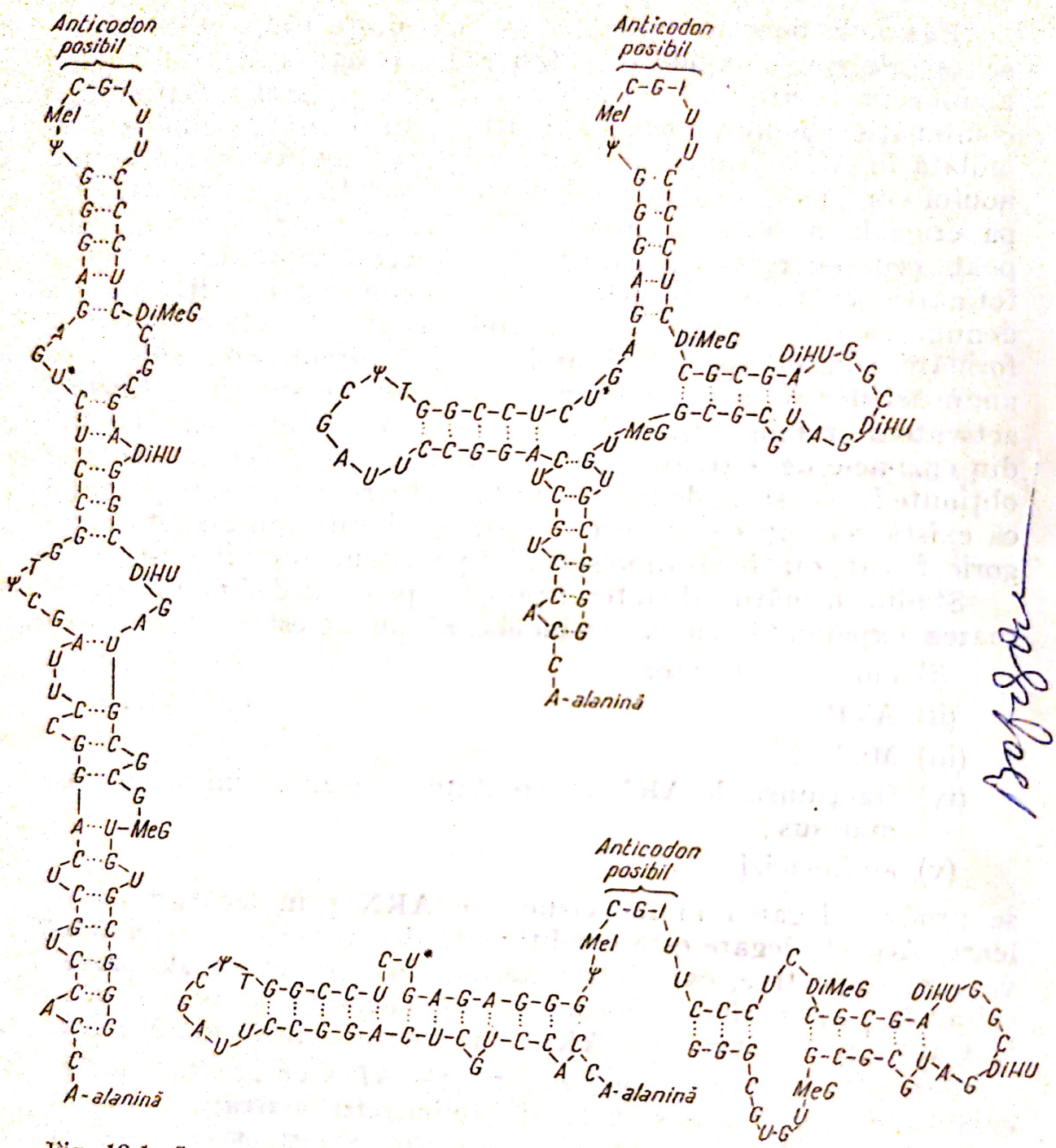


Fig. 12.1. Secvența bazelor la ARN de transfer pentru alanină din drojdia de bere.

Nu se știe precis care dintre segmentele lanțului se unesc între ele astfel încît să formeze împreună regiuni dublu elicoidale. În această figură sînt indicate trei configurații posibile în care numărul de împerecheri G—C este maxim (a se compara cu fig. 9.8). Buclele sînt redate ca în fig. 9.8, dar nu este cîtuși de puțin sigur că bazele care nu pot forma perechi Watson-Crick în regiunile dublu catenare sînt amplasate într-adevăr în acest mod.

T — ribotimidină; ψ — pseudouridină; DIHU — 4,5-dihidrouridină; U* — amestec de uridină și DIHU; MeG — 1-metilguanozină; DiMeG — N^2-dimetilguanozină; I — inozină; MeI — 1-metilinozină; anticodon — triplet de cod complementar unui triplet (codon) al ARN mesager (modificat după Holley, 1965).

(iv) guanozin-trifosfat ;

(v) anumite alte enzime din fracţiunea solubilă,

se constată că aminoacizii sînt transferaţi rapid în microzomi, unde are loc încorporarea lor ireversibilă în proteină. Datorită funcţiei sale speciale, astăzi acest ARN poartă, în general, denumirea de ARN de *transfer*, deşi uneori i se mai spune şi ARN solubil sau ARN acceptor.

Acizii ribonucleici de transfer sînt substanţe care prezintă un interes deosebit. Încă de la primele cercetări s-a constatat următorul fapt : dacă un preparat de ARN de transfer este saturat cu un aminoacid oarecare (spre exemplu, leucină), aceasta nu afectează capacitatea fracţiunii cercetate de a lega şi alţi aminoacizi. Ca şi enzimele activatoare, moleculele de ARN de transfer sînt de diferite feluri, fiecare acceptînd în mod specific un anumit aminoacid. Molecula acestor acizi ribonucleici (ARN) este monocatenară, conţine aproximativ 80 de baze, are o greutate moleculară de cca. 25 000 (cap. 9) şi cuprinde o serie de baze neobişnuite, printre care diferiţi derivaţi metilaţi şi 5-ribozil-uracil. Moleculele de ARN de transfer au fost studiate amănunţit, în ultimul timp, prin tehnici fizice şi chimice, demonstrîndu-se că lanţul de ARN este răsucit pe sine însuşi în aşa fel, încît se formează o moleculă cu formă dublu elicoidală, purtînd o buclă la unul din capete (fig. 12.1). Unele tipuri de ARN de transfer au putut fi izolate, analizîndu-se parţial secvenţa de baze din structura lor. Cercetările au arătat că bazele neobişnuite sînt situate în zona buclei terminale şi că în porţiunea elicoidală a moleculei se găseşte un şir lung de perechi guanină-citozină. Porţiunea terminală liberă a moleculei, de care se prinde aminoacidul, are o secvenţă de baze bine definită, care pare să fie aceeaşi pentru toate tipurile de ARN de transfer, indiferent de originea lor : toate moleculele se termină cu secvenţa : —C—C—A. Deşi aceste baze pot fi uşor îndepărtate din ARN de transfer, prezenţa lor este esenţială pentru legarea aminoacidului. Rezultă că specificitatea ARN de transfer pentru un anumit aminoacid trebuie să fie legată de o altă regiune a moleculei. Fiecare enzimă de activare trebuie să cuprindă deci la nivelul centrului său activ o zonă pentru legarea specifică a aminoacidului şi alta cu afinitate pentru regiunea specifică din molecula de ARN de transfer. Etapele sintezei proteice descrise pînă aci sînt reprezentate schematic în fig. 12.2.

Scanned with OKEN Scanner

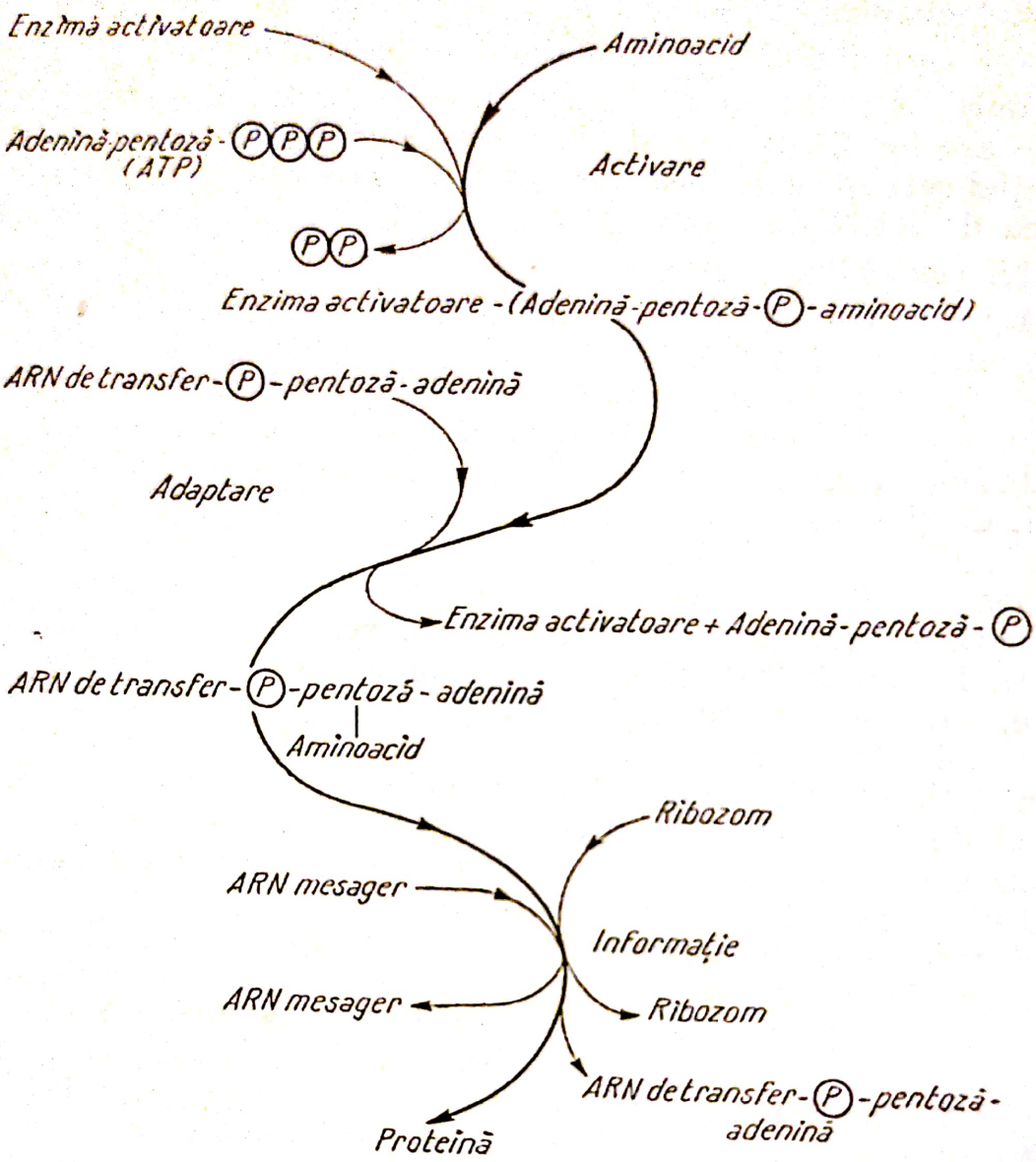


Fig. 12.2. Schemă a principalelor etape chimice în sinteza proteinelor.

ÎNCORPORAREA AMINOACIZILOR ÎN LANȚURILE PEPTIDICE

Să examinăm acum ce se întîmplă cu ARN de transfer și cu aminoacidul legat de el cînd ajunge la ribozom. Deși nu știm încă nimic sau prea puțin despre etapele biochimice ale acestui proces, există probe convingătoare pe baza cărora se poate trage concluzia că la nivelul ribozomilor aminoacizii sînt legați laolaltă,

Scanned with OKEN Scanner

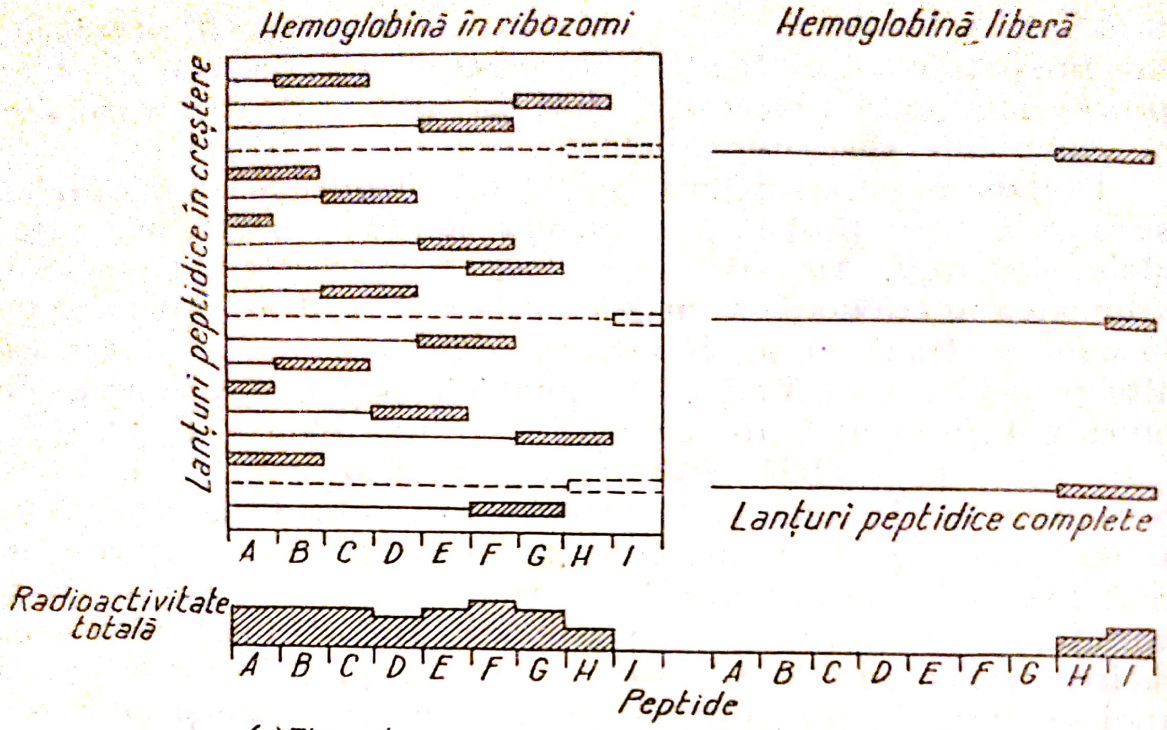
formîndu-se lanţuri peptidice care sînt apoi eliberate în citoplasmă sau în spaţiile intrareticulare ale reticulului endoplasmic. Acest proces de asamblare a fost studiat de către Dintzis printr-o serie de experienţe elegante, publicate în 1961.

Dintzis a supus iepuri unui tratament cu fenilhidrazină, substanţă care provoacă o anemie acută datorită distrugerii globulelor roşii. Animalul reacţionează la acest tratament prin aruncarea în circulaţie a unor globule roşii imature (reticulocite), în care continuă să se sintetizeze hemoglobină, dar prea puţin alte proteine. Dat fiind că fragmentele peptidice ale hemoglobinei pot fi identificate cu uşurinţă prin tehnica amprentelor (cap. 11), este posibilă cercetarea modului lor de sinteză. În experienţele lui Dintzis, reticulocitele provenite de la un animal astfel tratat au fost suspendate într-o soluţie care conţinea leucină marcată. După perioade de timp variind între 3 şi 60 de minute, sinteza proteică din reticulocite a fost întreruptă prin răcirea suspensiei într-o baie cu apă la gheaţă. Ribozomii au fost apoi separaţi de proteina solubilă prin centrifugare şi din toate aceste fracţiuni s-a extras hemoglobina care a fost supusă apoi acţiunii tripsinei, conform tehnicii descrise în cap. 11; diferiţii peptizi au fost separaţi şi identificaţi prin tehnica amprentei. În cele din urmă, s-a măsurat repartiţia leucinei marcate printre diferiţii peptizi.

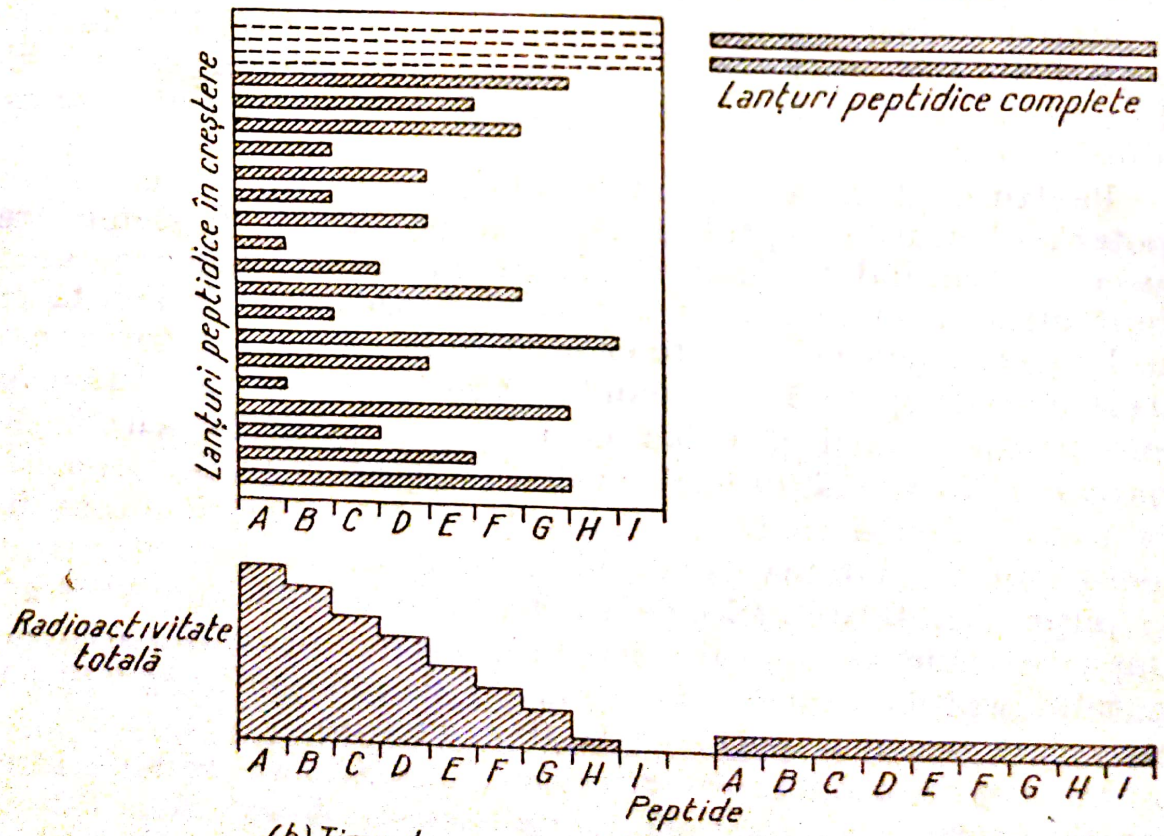
Pentru explicarea rezultatelor obţinute, s-a emis următoarea ipoteză: lanţurile peptidice ale hemoglobinei ar fi sintetizate succesiv, pornind de la unul din capete, prin depunerea, unul după altul, a aminoacizilor la nivelul ribozomilor; de îndată ce un lanţ este încheiat, el este eliberat în întregime în citoplasmă. Dacă această ipoteză corespunde cu realitatea şi dacă luăm în consideraţie numai proteina completă, o perioadă scurtă de marcare radioactivă, urmată imediat de oprirea sintezei proteice, va trebui să aibă ca rezultat apariţia radioactivităţii numai în zonele din vecinătatea capătului lanţului, care a fost sintetizat cu puţin înainte ca molecula să devină completă (fig. 12.3 *a*). După perioade de marcare mai îndelungate, toate fragmentele lanţului peptidic complet vor ajunge să fie radioactive în măsură mai mult sau mai puţin egală (fig. 12.3 *B*).

Să ne oprim acum la proteina parţial formată care, în momentul opririi sintezei, continuă să rămînă legată de ribozom. Cum într-o populaţie de ribozomi se vor găsi fragmente de hemoglobină

Scanned with OKEN Scanner



(a) Timp de marcare mai scurt decît cel al sintezei



(b) Timp de marcare mult mai lung decît cel al sintezei

în toate stadiile de sinteză, perioadele scurte de marcare nu vor asigura timpul necesar decît pentru sinteza a unul sau două fragmente; toate peptidele, indiferent de poziţia pe care o ocupă în moleculă, vor avea şanse egale de a fi marcate (fig. 12.3 *a*). Dacă perioada de marcare este mai lungă, numeroase molecule de proteină vor avea timpul să devină complete şi să se desprindă de pe ribozomi, dar vor mai rămîne legate de ribozomi molecule rămase în diverse stadii ale sintezei; toate acestea din urmă vor fi marcate în întregime. După cum se poate vedea din fig. 12.3 *b*, aceasta va face ca proba să conţină sensibil mai multe peptide provenite din fazele timpurii ale procesului de sinteză decît din cele tîrzii. Se observă astfel un gradient de marcare al cărui vîrf se află la primul peptid şi care scade progresiv pînă la cel din urmă. Acest tip de imagine este exact inversul celei care se obţine cu soluţii ce conţin hemoglobină completă ce a fost marcată pentru un interval de timp scurt. Rezultatele experimentale înregistrate cu lanţurile α (prezentate în fig. 12.4 *a* şi *b*) ne dau o imagine mai clară decît cele care se obţin cu lanţurile β. Din fig. 12.4 se poate vedea că în cazul proteinei complete, după o marcare de scurtă durată, se poate stabili o ordine destul de precisă a creşterii încorporării în diferitele fragmente începînd cu 21 şi 10 şi terminînd cu 16. Această imagine este exact opusul celei ce se obţine după o marcare de lungă durată a proteinei incomplete din ribozomi (fig. 12.4 *b*).

Pe baza rezultatelor acestor experienţe, Dintzis a putut elabora o schemă de aranjare a fragmentelor, în ordinea în care presupunea că se produce sinteza lor, deşi în acel moment nu fusese încă determinată secvenţa aminoacizilor din hemoglobină şi nu era cunoscută ordinea peptizilor în structura primară. Prin urmare, el nu dispunea de această probă paralelă pentru validarea concluziilor sale. Rezultatele experienţelor lui Dintzis au crescut

Fig. 12.3. Grafice ilustrînd experienţele lui Dintzis:

(*a*) timpul de marcare mai scurt decît cel al sintezei şi (*b*) timpul de marcare mult mai lung decît cel al sintezei. Cele două dreptunghiuri din stînga includ un număr de lanţuri polipeptidice în creştere. Segmentele groase şi subţiri ale fiecărei linii reprezintă porţiunile marcate şi nemarcate ale peptidelor respective. Toate lanţurile complete se găsesc la dreapta. Histogramele de sub dreptunghiuri indică radioactivitatea totală găsită în peptidele $A \rightarrow I$, la stînga pentru lanţurile incomplete şi la dreapta pentru cele complete. În jumătatea inferioară a figurii se presupune că s-au format mult mai multe lanţuri marcate în întregime în comparaţie cu lanţurile complete, dar numai parţial marcate care apar iniţial.

Scanned with OKEN Scanner

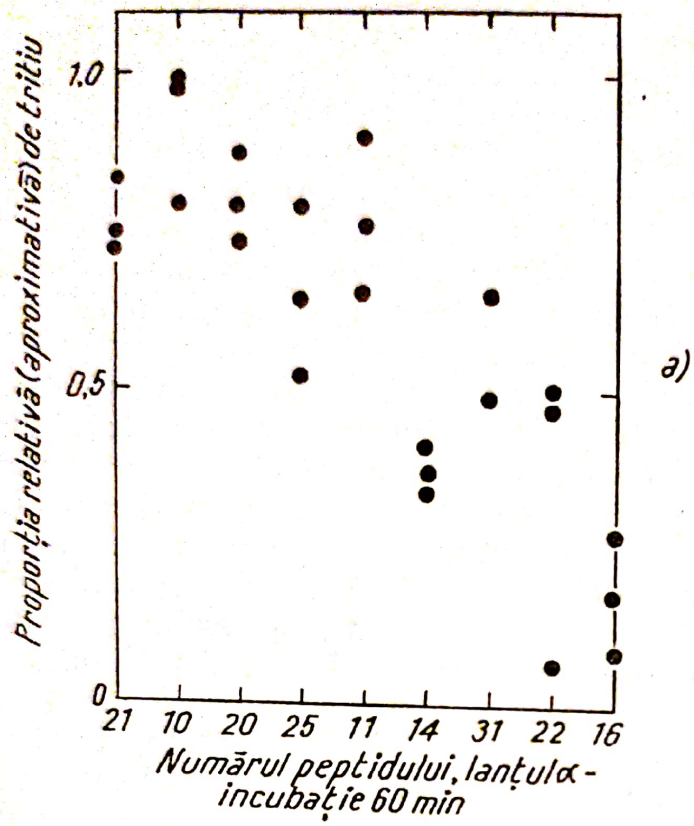


Fig. 12.4. Rezultatele experimentale ale lui Dintzis pentru lanțul α de hemoglobină. *a*) Molecule de hemoglobină completă în soluție; *b*) hemoglobină incompletă pe ribozomi.

Scanned with OKEN Scanner

în importanţă astăzi, cînd, în urma descifrării în mare parte a secvenţei din molecula de hemoglobină, s-a putut constata că ordinea peptizilor corespunde cu aceea postulată de acest autor. Există deci toate motivele să credem că hemoglobina ca şi, probabil, alte proteine sînt asamblate prin adăugarea succesivă de aminoacizi pornind de la capătul N terminal.

Se mai cuvine discutat un alt aspect: datele existente arată că asamblarea hemoglobinei în reticulocite se produce destul de lent, deoarece, pentru a se ajunge la marcarea tuturor peptidelor finite, sînt necesare 10—30 de minute. Acest fapt contrastează net cu timpul care, conform calculelor, pare necesar pentru sinteza enzimelor bacteriene şi care este de ordinul secundelor. S-ar putea ca, în experienţele lui Dintzis, mediul în care se aflau reticulocitele să nu fi fost optim pentru funcţia acestora. Dat fiind că cele mai multe din cunoştinţele noastre asupra controlului sintezei proteice derivă din studiul bacteriilor, rezultatele care se obţin cu alte tipuri de celule sînt deosebit de preţioase, deoarece ne permit să ne facem o oarecare idee asupra măsurii în care aspectele particulare, desprinse din studiul bacteriilor, pot fi generalizate şi sînt valabile pentru alte celule.

Înainte de a încheia această parte din capitolul sintezei proteice, mai trebuie subliniat rolul esenţial pe care îl joacă în acest proces nucleotizii trifosforilaţi. ATP este necesar în prima etapă, pentru formarea complexului adenil-aminoacid-enzimă de activare, dar şi pentru a furniza adenina terminală a ARN de transfer. După cum este de aşteptat, pentru reacţia prin care aceluiaşi ARN i se adaugă cei doi citidin-nucleotizi adiacenţi este nevoie de CTP; sînt necesare de asemenea mici cantităţi de UTP, fapt încă neexplicat. GTP este un factor esenţial pentru legarea de ribozom a ARN de transfer, dar reacţia chimică la care participă nu este nici ea cunoscută.

Pînă aici am descris datele din care rezultă că aminoacizii sînt mai întîi legaţi de ARN de transfer prin intermediul unei enzime, pentru ca apoi, împreună cu ARN, să fie transferaţi pe ribozomi, unde are loc asamblarea aminoacizilor în vederea formării lanţului peptidic. Problema importantă care se pune acum este următoarea: ce legătură există între acest mecanism al sintezei proteice şi materialul genetic; cu alte cuvinte, cum controlează ADN din cromozomi *ordinea* în care sînt legaţi aminoacizii la nivelul ribozomilor?

Scanned with OKEN Scanner

DOVEZI ALE EXISTENȚEI UNUI „MESAGER" CARE TRANSPORTĂ INFORMAȚIA GENETICĂ LA LOCUL SINTEZEI PROTEICE

Întrucît în celulele organismelor superioare sinteza proteică se desfăşoară în special în citoplasmă iar materialul genetic se află în nucleu, avem toate motivele să credem în existența unui factor intermediar care transportă informaţia de la gene la centrul de sinteză proteică din celulă. Pe de altă parte, cercetări efectuate pe celule incubate în prezența unor precursori radioactivi ai ARN au dovedit că aceştia din urmă sînt încorporaţi mai întîi în ARN din nucleu şi abia mai tîrziu apar în citoplasmă. Aceste observaţii sugerează că ARN este sintetizat în nucleu pentru ca ulterior să fie încorporat în ribozomi (deşi sînt posibile şi alte interpretări). Pînă de curînd, ribozomul însuşi era considerat drept cel mai probabil candidat pentru funcţia de intermediar între nucleu şi citoplasmă.

S-a emis astfel ipoteza, simplă şi atrăgătoare, după care ARN ribozomal ar fi sintetizat în nucleu, avînd o secvență de baze identică cu a unei sau a ambelor catene ale ADN ; ulterior, în ribozom, acest ARN va servi ca matriță pentru asamblarea moleculelor de aminoacizi ce se află legate de ARN de transfer. Conform acestei ipoteze, un ribozom dat ar fi trebuit să nu poată sintetiza decît o anumită proteină sau o anumită garnitură restrînsă de proteine. Pentru ca într-o celulă să fie oprită la un moment dat sinteza unei anumite proteine, ar trebui să se producă fie distrugerea, fie inactivarea ribozomilor respectivi. S-a demonstrat însă că ribozomii continuă să supravieţuiască timp îndelungat în bacterii, deşi la celulele acestea pot apărea modificări rapide şi marcate ale tipurilor de proteine sintetizate. Şi mai importantă a fost poate constatarea că raportul de baze din ARN ribozomal este diferit de cel caracteristic masei de ADN şi că primul nu este prea deosebit la diversele specii bacteriene ce diferă totuşi destul de mult între ele prin raportul de baze din ADN. Dacă se acceptă ideea că informaţia genetică din ADN este transferată în proteină prin intermediul controlului sintezei unui anumit tip de ARN, acesta nu putea fi ARN ribozomal, care nu îndeplineşte condiţiile necesare acestui rol. Pe de altă parte, ne-am fi aşteptat să existe o corelaţie între mărimea moleculelor de proteină sintetizată şi cantitatea de ARN din diferiţii ribozomi ; cercetări bazate pe centrifugări analitice au

Scanned with OKEN Scanner

arătat însă că la bacterii ribozomii sînt remarcabil de uniformi ca mărime.

Nici una din aceste critici aduse ipotezei ribozomale nu este totuşi pe deplin convingătoare; ele au determinat însă pe numeroşi cercetători să examineze o altă ipoteză, care a fost denumită „a ARN mesager". Pentru a o înţelege mai bine trebuie să luăm mai întîi în discuţie cîteva date noi.

Prima dintre aceste date derivă din cercetările de genetică efectuate de Monod, Jacob şi Wollman la Paris (unele aspecte ale acestor cercetări au fost deja discutate în cap. 10), care au furnizat prima dovadă a existenţei unui factor cu viaţă scurtă, intermediar între gene şi mecanismul sintezei proteice. Substratul experimental a fost din nou bacteria *E. coli* iar locusul genetic studiat a fost cel care controlează producerea β-galactozidazei, o enzimă care scindează lactoza în glucoză şi galactoză (cap. 10). Acest locus poate fi studiat cu uşurinţă prin experienţe de conjugare.

Anumite tulpini bacteriene pot da loc unui fenomen de conjugare; în acest caz, una din tulpini acţionează ca mascul şi transferă partenerului femel o parte din materialul său genetic. Experienţa poate fi astfel efectuată, încît să se aleagă drept partener femel o bacterie incapabilă să sintetizeze β-galactozidaza datorită unui defect mutaţional în gena structurală corespunzătoare. La rîndul său, celula masculă, deşi din punct de vedere genetic este aptă să sintetizeze enzima, nu o poate totuşi produce datorită acţiunii unui alt segment genetic, situat la distanţă de gena galactozidazei, într-o zonă a cromozomului care, în cursul conjugării, nu trece la femelă. Cît timp celulele nu intră în conjugare, sinteza enzimei nu poate avea loc. De îndată însă ce gena galactozidazică normală pătrunde în celula femelă, zigotul astfel produs devine capabil să sintetizeze enzima. Mai mult decît atît, s-a constatat că sinteza începe practic imediat după conjugare şi se desfăşoară într-un ritm absolut normal. Există două explicaţii posibile ale acestui fenomen: prima, după care proteina ar putea fi produsă în mod direct de către genă şi a doua conform căreia s-ar sintetiza foarte rapid un produs genic, mesagerul, care, la rîndul său, ar fi răspunzător de controlul sintezei noii proteine. Ultima explicaţie pare mult mai plauzibilă, deoarece, după cum am văzut, sinteza proteică are loc în cea mai mare parte în ribozom şi nu în cromozom. Experienţe suplimentare de genetică arată că, cel puţin la bacterii, mesage-

Scanned with OKEN Scanner

arătat însă că la bacterii ribozomii sînt remarcabil de uniformi ca mărime.

Nici una din aceste critici aduse ipotezei ribozomale nu este totuşi pe deplin convingătoare; ele au determinat însă pe numeroşi cercetători să examineze o altă ipoteză, care a fost denumită „a ARN mesager". Pentru a o înţelege mai bine trebuie să luăm mai întîi în discuţie cîteva date noi.

Prima dintre aceste date derivă din cercetările de genetică efectuate de Monod, Jacob şi Wollman la Paris (unele aspecte ale acestor cercetări au fost deja discutate în cap. 10), care au furnizat prima dovadă a existenţei unui factor cu viaţă scurtă, intermediar între gene şi mecanismul sintezei proteice. Substratul experimental a fost din nou bacteria *E. coli* iar locusul genetic studiat a fost cel care controlează producerea β-galactozidazei, o enzimă care scindează lactoza în glucoză şi galactoză (cap. 10). Acest locus poate fi studiat cu uşurinţă prin experienţe de conjugare.

Anumite tulpini bacteriene pot da loc unui fenomen de conjugare; în acest caz, una din tulpini acţionează ca mascul şi transferă partenerului femel o parte din materialul său genetic. Experienţa poate fi astfel efectuată, încît să se aleagă drept partener femel o bacterie incapabilă să sintetizeze β-galactozidaza datorită unui defect mutaţional în gena structurală corespunzătoare. La rîndul său, celula masculă, deşi din punct de vedere genetic este aptă să sintetizeze enzima, nu o poate totuşi produce datorită acţiunii unui alt segment genetic, situat la distanţă de gena galactozidazei, într-o zonă a cromozomului care, în cursul conjugării, nu trece la femelă. Cît timp celulele nu intră în conjugare, sinteza enzimei nu poate avea loc. De îndată însă ce gena galactozidazică normală pătrunde în celula femelă, zigotul astfel produs devine capabil să sintetizeze enzima. Mai mult decît atît, s-a constatat că sinteza începe practic imediat după conjugare şi se desfăşoară într-un ritm absolut normal. Există două explicaţii posibile ale acestui fenomen: prima, după care proteina ar putea fi produsă în mod direct de către genă şi a doua conform căreia s-ar sintetiza foarte rapid un produs genic, mesagerul, care, la rîndul său, ar fi răspunzător de controlul sintezei noii proteine. Ultima explicaţie pare mult mai plauzibilă, deoarece, după cum am văzut, sinteza proteică are loc în cea mai mare parte în ribozom şi nu în cromozom. Experienţe suplimentare de genetică arată că, cel puţin la bacterii, mesage-

Scanned with OKEN Scanner

rul nu poate controla activitatea ribozomilor decît un timp limitat după ce a părăsit gena, dat fiind că distrugerea sau scoaterea din funcţie a genei determină încetareai mediată a producerii enzimei.

Alte dovezi în favoarea ipotezei „mesagerului" derivă din studiile asupra comutării mecanismului de sinteză la bacterii, după infectarea lor cu bacteriofag. Într-adevăr, acesta determină sistarea sintezei de proteine bacteriene şi induce formarea de enzime şi de proteine de înveliş proprii bacteriofagului. De cîtva timp se ştie că după infecţie apare în bacterie un nou tip de ARN, care este sintetizat foarte rapid. Şi mai de curînd, Hall şi Spiegelman au arătat, cu ajutorul unei tehnici foarte elegante pe care o vom descrie mai jos, că secvenţa de baze a acestui ARN este probabil complementară cu a unei sau a ambelor catene ale ADN fagic şi nu cu catenele ADN bacterian.

Dacă o soluţie de ADN este încălzită, se produce desfacerea legăturilor de hidrogen răspunzătoare de împerecherea între ele a bazelor din cele două lanţuri (cap. 9). Dacă o asemenea soluţie este lăsată apoi să se răcească lent, aceste legături se pot forma din nou. Un ADN astfel renaturat îşi redobîndeşte activitatea biologică şi poate fi utilizat în experienţe de transformare bacteriană. Spiegelman a încălzit un ADN bacteriofagic, precum şi ARN nou format după infecţie şi i-a lăsat apoi să se răcească împreună. În aceste condiţii s-a format un complex specific ADN-ARN, constînd probabil dintr-un dublu helix alcătuit dintr-un lanţ de ADN şi unul de ARN. La repetarea acestor experienţe cu un ADN bacterian sau de altă origine, asemenea complexe nu se mai formau. O serie de alte experienţe asupra ADN sugerează că pentru a se forma asemenea complexe secvenţa bazelor din cele două catene trebuie să fie complementară pe o porţiune destul de lungă a moleculei. S-a găsit că asemenea complexe ADN-ARN se formează şi în mod natural în bacteriile infectate. Este deci probabil că ARN care se formează după infectare are o secvenţă de baze complementară cu cea a ADN fagic.

În aceeaşi perioadă în care se efectuau aceste experienţe, un alt grup de oameni de ştiinţă, incluzînd cercetători din Cambridge, Paris şi California, au studiat ce se întîmplă cu diferitele particule şi fracţiuni de ARN imediat după infectarea cu fag. Ei au constatat în primul rînd că în citoplasma bacteriană nu se formează ribozomi în întregime noi, ci proteinele nou sintetizate, destinate fagului, se sintetizează în ribozomii existenţi

Scanned with OKEN Scanner

în bacterie dinaintea infectării. De asemenea, s-a putut dovedi că noul ARN, sintetizat după infectare, se ataşează de ribozomii care participă activ la sinteza proteică (aşa-numiţii „ribozomi activi 70S" — vezi cap. 9).

Aceste experienţe de început au fost efectuate pe bacterii infectate cu fagi; ulterior, s-a putut dovedi însă că şi în bacteriile normale există o fracţiune de ARN cu viaţă scurtă care se leagă de aceşti ribozomi activi. Şi mai recent, o asemenea fracţiune de ARN, în care raportul de baze este mai apropiat de al ADN celular decît de al ARN ribozomal, a putut fi pusă în evidenţă nu numai la bacterii, ci şi la alte celule dintre cele mai variate. Se contura astfel din ce în ce mai mult ideea că atît în bacteriile normale, cît şi în alte celule, masa ARN ribozomal este de fapt „structurală" şi că rolul de matriţă revine altor molecule de ARN, ce pot fi încorporate în ribozomi. Aceste molecule de ARN, denumite *ARN mesageri* şi a căror secvenţă de baze este determinată de o anumită porţiune a ADN, ar fi cele ce dirijează asamblarea noilor lanţuri peptidice.

Este poate util să rezumăm cele discutate pînă acum cu privire la sinteza proteică:

1. Cercetări efectuate cu celule de cele mai diferite tipuri (bacterii, celule hepatice de mamifer, reticulocite, celule de meristem vegetal) au adus argumente convingătoare în sensul că principalii centri de sinteză proteică sînt ribozomii, şi că la această sinteză participă diversele tipuri de ARN de transfer şi de enzime de activare. Cu toate acestea, nu putem exclude complet intervenţia în unele celule a unor mecanisme diferite.

2. Acceptînd că ribozomii sînt, dacă nu singurii, în orice caz principalii centri de sinteză proteică, atunci trebuie admisă, cel puţin la acele celule care au un nucleu bine definit, necesitatea existenţei unui intermediar între nucleu şi citoplasmă. În multe celule, ARN este sintetizat probabil în nucleu şi trece apoi în citoplasmă.

3. La bacterii există un tip special de ARN, avînd o secvenţă de baze complementară cu cea a ADN şi care poate fi găsit în asociere atît cu ribozomii, cît şi cu ADN. La bacteriile infectate cu fag, acest ARN este cel care controlează tipul de proteină produs de ribozomul bacterian.

4. Fracţiuni similare de ARN apar şi în alte tipuri de celule, la mamifere şi la plante. La aceşti ARN, raportul de baze este

apropiat de cel caracteristic ADN, dar încă nu s-a dovedit că ei pot forma complexe specifice cu ADN.

5. La bacterii, mesagerul are o viaţă scurtă şi, implicit, îşi poate exercita controlul asupra tipului de proteină sintetizat de ribozom numai pe o durată scurtă de timp, după care este înlocuit de un alt mesager, similar sau diferit.

6. Dovezi ce derivă din cercetări efectuate *in vitro* cu fracţiuni celulare de reticulocite şi bacterii arată că, în aceste condiţii, sinteza proteică poate continua să se desfăşoare şi în absenţa cromozomilor şi, pare-se, chiar în absenţa unui mesager nou format, ritmul sintezei însă fiind probabil redus.

Urmează să examinăm acum altă serie de dovezi pe care se sprijină această concepţie generală ; este vorba de ceea ce denumim astăzi „problema codului".

CODUL

Dacă este adevărat că ADN controlează sinteza proteinelor specifice, este normal să ne întrebăm cum poate o secvenţă de nucleotizi alcătuită din cele patru tipuri de baze caracteristice ADN să determine ordinea de legare laolaltă a celor 20 de aminoacizi diferiţi, în cadrul procesului de formare a unui lanţ peptidic. O asemenea problemă, care tratează traducerea unui mesaj scris cu ajutorul unui alfabet compus din patru litere într-un mesaj similar scris cu un alfabet de 20 de litere este o problemă de codificare. Imediat după formularea teoriei structurii dublu elicoidale a ADN, care presupune implicit şi existenţa unui mecanism exact de replicare a celor două lanţuri complementare, a început să se pună şi problema modului în care ar putea funcţiona un asemenea cod. Evident că o singură bază, fie ea A, T, C sau G (A = adenină ; T = timină ; C = citidină ; G = guaniină), nu poate să specifice mai mult de un aminoacid, ceea ce ar da un total de patru. La fel de simplu se poate vedea că nici combinaţiile de cîte două baze :

AA	AT	AC	AG
TA	TT	TC	TG
CA	CT	CC	CG
GA	GT	GC	GG

nu vor fi suficiente pentru codificarea celor 20 de aminoacizi, chiar dacă admitem că în specificarea acestora joacă un rol şi ordinea bazelor, respectiv că AT codifică altceva decît TA etc.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă însă la codificarea unui aminoacid participă trei baze, numărul posibil de triplete se ridică la 64 ($4 \times 4 \times 4$), ceea ce asigură un belşug de combinaţii pentru codificarea tuturor aminoacizilor. Pare deci probabil că fiecare „cuvînt" al codului ADN, ce specifică un aminoacid, trebuie să conţină cel puţin trei litere.

Întrucît în construcţia ADN nu intră nici un element structural care să poată întrerupe secvenţa bazelor, pentru a asigura spaţiile dintre cuvinte, se ridică problema modului în care mecanismul de citire distinge sfîrşitul unui cuvînt de începutul celui următor. Dacă vom scrie o parte dintr-o propoziţie în limbajul codului nostru:

... ATTCGCATAGCA ...

şi presupunem că fiecare cuvînt are trei litere, este limpede că vom putea forma cuvinte diferite în funcţie de punctul din care pornim:

ATT CGC ATA...

sau, de exemplu,

A TTC GCA TAG...

Pentru a învinge această dificultate, Crick şi colaboratorii săi au propus o teorie ingenioasă descrisă într-un articol intitulat „Codul fără virgule". Ei au emis ipoteza că, dacă — pentru a ramîne la exemplul nostru — ATP, CGC şi ATA sînt cuvinte care au un înţeles, atunci toate tripletele care le *încalecă* pe acestea, cum sînt TTC TCG, GCA şi CAT etc. sînt cuvinte fără înţeles, respectiv mesaje absurde. Ei au calculat apoi că cele 64 de triplete pot fi împărţite, după o serie de criterii, în două clase: o clasă conţinînd 20 de triplete care au înţeles iar cealaltă clasă — 44 de triplete fără înţeles. Or, numărul de aminoacizi găsiţi în natură este tocmai 20, dacă facem abstracţie de cei cîţiva, cum ar fi cistina şi hidroxiprolina care pot fi consideraţi că derivă dintr-unul din cei 20 de aminoacizi esenţiali. Este oare aceasta o simplă coincidenţă? Astăzi avem convingerea că a fost într-adevăr o coincidenţă, dar la timpul respectiv faptul părea revelator, cu atît mai mult cu cît oamenilor de ştiinţă, ca şi tuturor oamenilor de altfel, le plac soluţiile simple şi clare.

O altă cale de rezolvare a problemei începutului şi sfîrşitului cuvintelor este de a presupune că toate cuvintele sînt într-adevăr reprezentate de triplete, dar că există o punctuaţie care marchează începutul fiecărei fraze. În ultimul timp, Crick, Barnett, Brenner şi Watts-Tobin au adus efectiv dovezi în fa-

Scanned with OKEN Scanner

voarea existenței unui astfel de cod. Acești autori au utilizat metoda de analiză genetică a lui Benzer, despre care a fost vorba în cap. 10, și au studiat cei doi cistroni care controlează spectrul de gazde al bacteriofagului T_4 pentru tulpina de *E. coli* K 12. Ei și-au concentrat însă atenția asupra unei mutații mai puțin obișnuite, provocată de acridin-orange și care pare să rezide în deleția sau inserția unei singure baze în molecula de ADN.

Pentru a ușura înțelegerea acestor rezultate importante, cel mai simplu este să ne folosim de un model și să-i studiem comportarea. Să presupunem că un șir de baze poate fi citit numai de la stînga la dreapta, că nu există nici un semn care să ne indice unde sfîrșește un cuvînt și unde începe următorul și că citirea codului se face pe grupe de cîte trei baze, începînd de la un punct M situat la începutul fiecărei propoziții. Spre exemplu:

M ATTCGCATAGCAGCT...

se citește în mod normal

ATT CGC ATA GCA GCT...

Să admitem acum că, din întîmplare, agentul mutagen elimină primul C din stînga. Propoziția va fi citită în acest caz:

ATT $\bar{G}$CA TAG CAG ...,

semnul $^-$ marcînd locul în care s-a produs deleția. După cum se vede, drept consecință toate cuvintele apărute în dreapta semnului $^-$ sînt greșite, ceea ce se va manifesta prin defectivitatea tulpinii. Presupunînd acum că putem să producem o nouă mutație care *inseră* o bază nouă, notată cu $\overset{+}{X}$ undeva la dreapta deleției anterioare, vom obține:

ATT $\bar{G}$CA TAG C$\overset{+}{X}$A GCT ...,

în care X poate fi oricare din cele patru baze. Se observă că tripletele 5, 6 și următoarele pot fi citite acum corect și că numai tripletele 2, 3 și 4 rămîn greșite. Ar fi deci posibil ca, în cazul în care cei trei aminoacizi „greșiți" nu afectează în măsură importantă structura proteinei, tulpina respectivă de fag să revină la tipul sălbatic. Este tocmai ceea ce s-a constatat în experien-

ţele menţionate; un fag cu mutaţii + şi —, situate la distanţe scurte, se poate dezvolta normal; cu cît cele două defecte, + şi —, vor fi însă mai depărtate unul de altul, cu atît va fi mai puţin probabil ca urmările lor să mai poată fi anihilate.

După ce au fost izolate un număr apreciabil de tulpini cu mutaţii + şi — situate în locuri diferite pe cistronul B al fagului T_4, s-a trecut la studierea recombinantelor obţinute între aceste tulpini. Rezultatele au arătat că două mutaţii + duc la un fag mutant care se comportă defectiv, aşa cum este de aşteptat din citirea propoziţiei:

$$\overset{+}{\text{ATX}}\ \text{TCG}\ \overset{+}{\text{CAX}}\ \text{TAG}\ \text{CAG}\ \ldots$$

Rezultate similare au fost obţinute şi cu două mutante.

Este însă izbitor faptul că trei mutaţii plus sau minus duc la un fenotip "sălbatic" de tipul:

$$\overset{+}{\text{ATX}}\ \overset{+}{\text{TCX}}\ \text{GCA}\ \overset{+}{\text{XTA}}\ \text{GCA}\ \text{GCT}\ \ldots$$

Examinînd aceste triple mutante, se poate vedea că tripletul care iniţial era al patrulea (devenit acum al cincilea) şi tripletele următoare revin la tipul normal. Este de presupus că în asemenea cazuri tripletul suplimentar nu împiedică sinteza proteinei şi că dacă în acest loc se adaugă un aminoacid suplimentar, aceasta nu afectează funcţia proteinei. Exceptînd cazul că mutagenul elimină sau adaugă două ori mai multe baze dintr-o dată, ceea ce este mai puţin probabil, rezultatul expus mai sus constituie un argument foarte convingător în sensul că ipoteza alcătuirii din triplete a codului este cea corectă. Se pare că dificultatea de a decide cu care literă începe fiecare cuvînt nu este rezolvată prin ipoteza unui „cod fără virgule", ci prin admiterea existenţei unei punctuaţii care să asigure ca citirea fiecărei propoziţii să înceapă de la locul potrivit.

Crick şi colaboratorii săi au imaginat o experienţă care aduce un argument puternic în favoarea acestei ipoteze a punctuaţiei. Toate mutaţiile prin acridină descrise pînă aci erau situate în apropierea acelui capăt al cistronului B care este vecin cu cistronul A al fagului T_4. În experienţa la care ne referim s-a reuşit utilizarea unui alt tip de mutaţie, descoperită de către Benzer şi care se caracterizează prin pierderea din ADN a porţiunii care cuprinde capetele vecine ale cistronilor A şi B, fără ca to-

tuşi aceasta să afecteze funcţiunea cistronului B. În mod normal, în absenţa acestei deleţii, mutaţiile produse în cistronul A nu au niciodată vreun efect asupra funcţiei cistronului B şi invers. Dacă însă intervine această deleţie, efectul unei mutaţii de tip acridinic, care elimină sau adaugă o bază în cistronul A, se propagă şi asupra cistronului B, anihilînd şi funcţiile acestuia. De aici rezultă că, în această mutantă, datorită deleţiei de la joncţiunea dintre cistroni, s-a pierdut un „punct" sau semn care în mod normal împiedică o mutaţie acridinică apărută într-un cistron să se repercuteze asupra cistronilor vecini. S-ar putea ca acest „punct" să fie reprezentat de o secvenţă de baze specială, diferită de cele care codifică aminoacizii.

DESCIFRAREA CODULUI

Identificarea cuvintelor codului, adică a tripletelor care specifică fiecare aminoacid, poate fi realizată teoretic pe diferite căi. În prezent există, spre exemplu, metode care apelează fie la fracţionarea pe coloană, fie la centrifugarea în gradient de densitate, ce fac posibilă purificarea şi izolarea unor fragmente de ADN conţinînd unul sau cel mult cîţiva cistroni. Asemenea molecule de ADN ar putea fi suficient de mici pentru a permite o tentativă de analizare a *secvenţei* bazelor lor, urmată de confruntarea rezultatului obţinut cu secvenţa aminoacizilor din proteină. O altă metodă mai puţin directă constă în utilizarea unor mutageni specifici care modifică un singur tip de baze în ADN, urmată de determinarea aminoacizilor din proteină care au fost afectaţi de mutaţiile respective. Aceste tehnici sînt amîndouă complicate, deşi după cum vom vedea, cea de a doua a fost utilizată cu mult succes în cercetările efectuate asupra VMT la care a putut fi pusă în evidenţă, în mai multe cazuri, înlocuirea cîte unui singur aminoacid.

Un mod de abordare mult mai simplu a fost descoperit în 1961 de către Nirenberg şi Matthaei printr-o serie de experienţe strălucite. Aceşti cercetători au studiat încorporarea aminoacizilor în proteina ce se formează în preparate de ribozomi extraşi din *E. coli* suplimentate cu ARN de transfer şi cu cofactorii necesari. Ei au constatat că de pe ribozom putea fi separat un ARN cu greutate moleculară mare capabil să determine încorporarea intensă de aminoacizi. Şi mai importantă a fost însă constatarea că un poliribonucleotid artificial ce nu conţinea decît o singură bază, uridina (sintetizat cu ajutorul unei polinucleotid-

Scanned with OKEN Scanner

fosforilaze — cap. 9), ducea la formarea în ribozomi a unor lanţuri peptidice cu greutate moleculară relativ mare în care nu se încorporase decît un singur aminoacid: fenilalanina. În lanţurile peptidice nu fusese încorporat nici un alt aminoacid iar uridina în formă nepolimerizată nu era capabilă să declanşeze acest proces.

Se pare deci că acidul poliuridilic (poli-rU) acţionează în acest caz ca un ARN mesager, tripletul UUU fiind prin urmare primul cuvînt cunoscut al codului. El „înseamnă" fenilalanină. La scurt timp după ce această descoperire a devenit cunoscută, mulţi cercetători, printre care şi Ochoa, au studiat efectul altor poliribonucleotizi asupra ribozomilor. După unele dificultăţi iniţiale, care păreau să indice că numai poliribonucleotizii ce conţin U ar fi funcţionali, s-a găsit că poli-rA codifică lizina şi poli-rC -prolina (poli-rG nu poate fi polimerizat de aceeaşi polinucleotid-fosforilază). În plus, s-a arătat că polimerii micşti, care conţin două sau mai multe baze, determină în consecinţă încorporarea mai multor aminoacizi.

Tehnica utilizată în aceste experienţe constă în prepararea unor polinucleotizi conţinînd proporţii diferite de baze — spre exemplu de U şi A — şi în studierea diferiţilor aminoacizi care sînt încorporaţi sub acţiunea unui asemenea polimer. Cum enzima de polimerizare leagă între ei U şi A într-o ordine întîmplătoare, va rezulta un număr egal de cuvinte alcătuite dintr-un singur fel de literă (UUU sau AAA), precum şi un număr comparativ mai mare de cuvinte care conţin fie 2U şi un A, fie 2 A şi un U. Întrucît asemenea secvenţe mixte vor cuprinde toate tipurile de triplete ce pot rezulta din combinaţii ale acestor baze şi din dispunerea lor în ordine diferită, este de prevăzut că poliribonucleotidul va determina încorporarea mai multor aminoacizi; în cazul exemplului dat s-a constatat că, pe lîngă fenilalanină, se încorpora şi izoleucină, lizină şi tirozină. În experienţe ulterioare, în care s-au utilizat proporţii variabile de U şi A, s-a constatat că izoleucina şi tirozina erau încorporate în măsură mai mare dacă amestecul conţinea mai mult U decît A, în timp ce poliribonucleotidul care conţinea mai mult A decît U determina încorporarea predominantă a lizinei. Dacă admitem existenţa unui cod format din triplete, atunci este probabil că 2U + + A codifică izoleucina şi tirozina în funcţie de ordinea bazelor în interiorul tripletului iar 2A + U sau AAA codifică lizina.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste experienţe nu ne dau însă informaţii asupra ordinii bazelor din triplete. Asemenea date au putut fi obţinute de curînd prin utilizarea unor polinucleotizi cu lanţ scurt şi cu secvenţe de baze cunoscute. Aceştia au fost utilizaţi în două moduri. Nirenberg a incubat ribozomi în prezenţa unor trinucleotizi cunoscuţi şi a observat că în aceste condiţii are loc legarea preferenţială de ribozom a unui anumit ARN de transfer cu aminoacidul legat de el. Se admite că trinucleotidul cu secvenţă cunoscută reprezintă codonul (tripletul care codifică) corespunzător aminoacidului respectiv. Ulterior, Khorana şi colaboratorii săi au reuşit, printr-o serie de experienţe elegante, nu numai să confirme codonii pentru anumiţi aminoacizi, dar au şi adus noi dovezi în sprijinul tezei după care codul ar fi alcătuit din triplete. Ei au preparat mai întîi doi decadezoxiribonucleotizi TCTCTC-TCTC şi AGAGAGAGAG. Aceştia au fost utilizaţi apoi drept matriţă iniţiatoare (primer); pornind de la aceasta, în prezenţa enzimei lui Kornberg, se forma un ADN artificial lung avînd în unul din lanţuri secvenţa repetitivă TCTCTC ... şi în celălalt lanţ, secvenţa AGAGAG ... Dacă acest ADN era utilizat apoi ca matriţă iniţiatoare pentru sinteza de ARN, într-un sistem în care exista ARN-polimerază şi numai UTP şi CTP, se obţinea un poliribonucleotid lung de tipul UCUCUC ... Acesta a putut fi utilizat drept mesager artificial pentru sinteza proteică şi a determinat apariţia unui polipeptid cu structură repetitivă în care alternau resturi de serină şi leucină.

Pe baza acestor experienţe şi a altora asemănătoare a putut fi dedus catalogul care este redat în tabelul 12. 1. Elementul cel mai important care reiese din aceste rezultate este faptul că o serie de aminoacizi pot fi codificaţi nu numai de un singur triplet, ci de mai multe. Într-adevăr, se pare că pentru cei mai mulţi aminoacizi este esenţială specificarea numai a primelor două baze ale codonului. Un cod de acest fel, în care mai multe triplete codifică un acelaşi aminoacid, poartă denumirea de cod *degenerat*. Caracterul degenerat reiese şi din analiza amănunţită a modului în care se produc înlocuirile de aminoacizi la VMT; experienţele făcute în acest sens vor fi prezentate pe scurt în paragraful următor.

În sprijinul rezultatelor obţinute cu ajutorul acestor sisteme studiate *in vitro* au venit observaţii efectuate cu ajutorul unei alte tehnici. Este vorba de cercetarea efectelor exercitate asupra

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 12.1

Codul dedus pe baza experienţelor cu polinucleotizi in vitro

O parte din aceste corespondenţe (CUA, AUA, UGA) nu au fost determinate încă cu certitudine

UUU	fen	UCU	ser	UAU	tir	UGU	cis
UUC		UCC		UAC		UGC	
UUA	leu	UCA		UAA	terminal	UGA	— terminal
UUG		UCG		UAG		UGG	— tri
CUU	leu	CCU	pro	CAU	his	CGU	arg
CUC		CCC		CAC		CGC	
CUA		CCA		CAA	gluNH$_2$	CGA	
CUG		CCG		CAG		CGG	
AUU	ileu	ACU	tre	AAU	asp NH$_2$	AGU	ser
AUC		ACC		AAC		AGC	
AUA		ACA		AAA	liz	AGA	arg
AUG	— met	ACG		AAG		AGG	
GUU	val	GCU	ala	GAU	asp	GGU	gli
GUC		GCC		GAC		GGC	
GUA		GCA		GAA	glu	GGA	
GUG		GCG		GAG		GGG	

(După Nirenberg, M. W. şi colab., „Proc. nat. Acad. Sci. Wash.", *53*, 1965, 1161 completat după Brenner şi colab., „Nature", *213*, London, 1967, 449.

ARN din VMT de către acidul nitros, care transformă în mod specific C în U şi A în C. ARN viral nu numai că determină tipul de leziune produsă de virus, care permite selectarea mutantelor, dar guvernează de asemenea şi sinteza proteinei din particula virală a cărei secvenţă de aminoacizi este cunoscută astăzi la tulpinile sălbatice (fig. 3.6). Examinarea pînă în prezent a unui număr destul de mare de mutante induse cu acid nitros a arătat că majoritatea mutantelor la care fusese afectată structura primară a proteinei se caracterizau prin înlocuirea unui singur aminoacid. Din cei 157 de aminoacizi care alcătuiesc această proteină, în urma tratamentului cu acid nitros au fost modificaţi numai 16. De asemenea, s-a constatat că atunci cînd se produce înlocuirea unui singur aminoacid dintr-o anumită poziţie, alegerea înlocuitorului este îngrădită de restricţii foarte precise. Spre exemplu, leucina poate fi înlocuită numai de fenilalanină. În cazul altor aminoacizi există doi înlocuitori posibili : prolina

Scanned with OKEN Scanner

poate fi înlocuită prin serină sau leucină, dar de nici un alt aminoacid.

Prin compararea unei liste a acestor înlocuiri limitate cu substituţiile de baze induse de acidul nitros, se poate determina compoziţia tripletelor care codifică anumiţi aminoacizi, fără a se putea afla însă şi ordinea bazelor din fiecare triplet. Dintre înlocuirile de aminoacizi studiate pînă în prezent, cele mai multe concordă destul de bine cu rezultatele experienţelor efectuate *in vitro* cu polinucleotizi. Rezultate similare se pot obţine şi prin studiul hemoglobinelor anormale, în care o mutaţie naturală provoacă o substituţie a unui aminoacid prin altul. Toate aceste substituţii sînt compatibile cu codul redat în tabelul 12.1 şi constituie în consecinţă un argument în favoarea universalităţii codului, cu alte cuvinte în favoarea ideii că aceleaşi triplete codifică aceiaşi aminoacizi atît la virusuri, cît şi la bacterii sau la alte celule.

A priori ar fi de aşteptat să existe un acelaşi cod pentru toate organismele vii, deoarece se consideră că evoluţia s-a produs ca urmare a unui mare număr de mutaţii distincte în diferite regiuni ale ADN. Este greu de conceput o modalitate prin care codul să fie modificat prin alterarea mecanismului de citire, astfel încît să se ajungă, în organismul respectiv, la înlocuirea, spre exemplu, a fiecărei leucine prin tirozină, fără ca aceasta să ducă la rezultate catastrofale. Pe de altă parte este tot atît de puţin probabil ca un cod universal să apară complet şi perfect o dată cu primul organism. Codul trebuie să fi evoluat şi el, fiind totodată posibil ca mai multe coduri diferite să fi evoluat independent unul de celălalt, astfel încît să se ajungă, de exemplu, ca vertebratele să aibă un cod întrucîtva diferit de cel al bacteriilor.

Această problemă s-a impus cu tărie acum cîţiva ani, o dată cu descoperirea faptului că la specii bacteriene deosebite raportul de baze este extrem de diferit. Într-adevăr, raportul $\frac{A + T}{G + C}$ variază de la 0,35 la 2,2. Aceste bacterii posedă oare proteine atît de diferite, încît să necesite tipuri aşa de deosebite de ADN sau trebuie să deducem de aici că la unele dintre ele sau la toate codul este diferit? Ar fi de aşteptat ca numeroase enzime şi alte tipuri de proteine să fie similare la toate bacteriile, dar recent s-a dovedit că proteine care îndeplinesc funcţii asemănătoare au compoziţii globale în aminoacizi diferite şi că, în cazul anumitor aminoacizi, există o corelaţie între proporţia în care se găseşte

Scanned with OKEN Scanner

acel aminoacid într-o bacterie dată și raportul $\frac{A + T}{G + C}$ specific pentru aceasta. Cum însă există un grad avansat de degenerare și ca atare numeroși aminoacizi pot fi codificați de mai multe triplete cu o compoziție în baze diferită, este probabil că variațiile raportului $\frac{A + T}{G + C}$ la bacterii sînt totuși compatibile cu existența unui cod universal.

Vom încheia acest paragraf cu discutarea problemei lanțului complementar din ADN. Am văzut în cap. 9 că există două ipoteze alternative asupra sintezei unui ARN cu o secvență de baze specifică: fie că noul ARN ia naștere în șanțul adînc al dublului helix al ADN, fie că, în cursul sintezei ARN, ADN adoptă o structură monocatenară, noul ARN formîndu-se printr-un proces similar cu duplicarea ADN. În unele privințe, ultima ipoteză este mai atrăgătoare, deoarece schema împerecherilor Watson-Crick oferă o imagine precisă a modului în care ADN poate determina secvențele specifice ale unui nou ARN. În acest caz se ridică însă problema dacă ambele lanțuri ale ADN sînt utilizate ca purtători ai informației genetice. S-ar putea ca unul din lanțuri să nu participe în procesul de codificare, deși are un rol esențial în cel de replicare.

O experiență recentă a lui Marmur arată că, în celulă, numai unul din lanțurile de ADN transferă informația sa către ARN. În ultimul timp, au fost descoperiți fagi al căror ADN se deosebește de cel al majorității celorlalți fagi în sensul că după denaturarea prin căldură și răcirea rapidă, urmată de apariția formei monocatenare, acest ADN poate fi separat în două fracțiuni. Fiecare fracțiune conține numai unul din cele două lanțuri complementare ale ADN nativ. Această separare este posibilă deoarece la fagii respectivi cele două lanțuri diferă destul de mult prin compoziția lor în baze. Marmur a marcat și izolat ARN sintetizat în cursul fazei timpurii a infectării bacteriilor cu acești fagi și a găsit că el nu poate forma complexe ADN-ARN decît cu una din catenele de ADN. ARN-polimeraza, enzimă care polimerizează ARN în prezența unei matrițe inițiatoare de ARN, este incapabilă să distingă, în experiențe *in vitro*, o catenă de ADN de cealaltă și în consecință le utilizează pe amîndouă fără discriminare. Este posibil ca celula să dispună de un anumit mecanism care să asigure copierea numai a unuia din cele două lanțuri.

Scanned with OKEN Scanner

Va trebui să părăsim acum această latură a subiectului nostru, care cunoaşte astăzi o dezvoltare atît de impetuoasă, pentru a ne ocupa pe scurt de soarta mesagerului după ajungerea lui la ribozom.

INTERACŢIUNEA DINTRE ARN MESAGER ŞI ARN DE TRANSFER LA NIVELUL RIBOZOMULUI

Experienţele lui Nirenberg ne-au dat posibilitatea să examinăm mai îndeaproape procesele chimice care au probabil loc în ribozomi. Cea mai simplă ipoteză ar fi să considerăm că ARN mesager furnizează locurile specifice de care să se poată lega moleculele de ARN de transfer pentru a aşeza aminoacizii pe care îi transportă către extremitatea de creştere a lanţului peptidic. Acestei scheme i se pot aduce mai multe obiecţii. În primul rînd, ea nu explică de ce ARN de transfer conţine 80 de baze şi nu numai cele 3 esenţiale. În al doilea rînd, ea explică numai rolul ARN mesager, nu însă şi funcţia restului din masa de ARN a ribozomului.

Nu trebuie totuşi să se treacă cu vederea faptul că în sinteza proteică ARN de transfer are două funcţii: el trebuie să recunoască atît enzima de activare, care va realiza legătura sa cu aminoacidul, cît şi tripletul corespunzător al ARN mesageri de care se va ataşa în mod specific la nivelul ribozomului. Ipoteza cea mai simplă pentru explicarea dimensiunii ARN de transfer este că bazele care nu alcătuiesc tripletul de codificare determină înfăşurarea ARN într-o anumită structură tridimensională, esenţială pentru funcţionalitatea sa. S-a văzut (fig. 12.1) că el seamănă probabil cu un ac de păr prevăzut cu o buclă, deşi nu este exclus să ia forme diferite în cursul interacţiunii cu enzima de activare.

Rolul cu totul special pe care îl joacă ARN de transfer în sinteza proteică a fost evidenţiat cu claritate în următoarea experienţă ingenioasă: aminoacidul cisteină a fost legat mai întîi de ARN de transfer corespunzător, prin intermediul enzimei de activare specifice. Cisteina a fost convertită apoi în alanină cu ajutorul unui catalizator denumit nichel Raney, operaţie care nu a modificat nici legătura dintre aminoacid şi ARN de transfer,

Scanned with OKEN Scanner

nici structura acestuia din urmă. A devenit astfel posibil ca, pornind de la experienţele de tip Nirenberg (tabelul 12.1) şi de la descoperirea, cu ajutorul lor, a faptului că poli-rUG determină în mod normal încorporarea în proteină a cisteinei, nu însă şi a alaninei, să se răspundă la următoarea întrebare: elementul pe care îl „recunoaşte" poli-rUG este oare aminoacidul sau ARN de transfer? Rezultatele au arătat că poli-rUG determină încorporarea în proteină a alaninei numai atunci cînd aceasta era legată de ARN de transfer specific cisteinei, nu însă şi cînd era legată de ARN de transfer specific pentru alanină. Aceasta confirmă în mod evident ipoteza originală emisă de Crick, după care ARN de transfer acţionează ca o „piesă de racordare" între aminoacid şi ARN mesager, ce determină secverţa.

Necesitatea prezenţei în ribozomi de ARN structural şi îndeosebi morfologia specială a ribozomului sînt mai greu de explicat. O parte din ARN găsit în fracţiunea ribozomală este cu siguranţă reprezentată de ARN mesager aflat în trecere, precum şi de o serie de diferiţi ARN de transfer ce sînt tocmai în curs de a-şi îndeplini funcţia de legare a aminoacizilor lor de lanţul de proteină pe cale de creştere. Raporturile de baze şi greutatea moleculară medie a ARN din ribozomi sînt totuşi de asemenea natură, încît sugerează ideea că trebuie să existe aici şi un tip realmente diferit de ARN. Trebuie să ne întoarcem de aceea la presupunerea că atît acest ARN, cît şi structura complexă a particulei ribozomale sînt necesare pentru orientarea componentelor care iau parte la acest stadiu al sintezei peptidice şi poate, de asemenea, pentru a controla în plus modul în care se va înfăşura peptidul după terminarea sintezei sale.

Există din ce în ce mai multe dovezi, bazate pe de o parte pe date de microscopie electronică, pe de altă parte pe experienţe de centrifugare, care arată că un grup de ribozomi care sintetizează activ proteină poate fi menţinut laolaltă de către un singur lanţ de ARN mesager (cap.9). Se presupune că fiecare ribozom stabileşte contactul cu ARN mesager prin unul din capetele acestuia şi că molecula de ARN mesager este destul de lungă pentru a asigura codificarea cîtorva proteine înrudite (complexul operonului, vezi cap. 10). Conform vederilor actuale, ribozomul s-ar deplasa de-a lungul mesagerului, sintetizînd lanţurile peptidice corespunzătoare. Pe un mesager se pot deplasa în acelaşi timp mai mulţi ribozomi. Asemenea ribozomi „mobili" trebuie evident

Scanned with OKEN Scanner

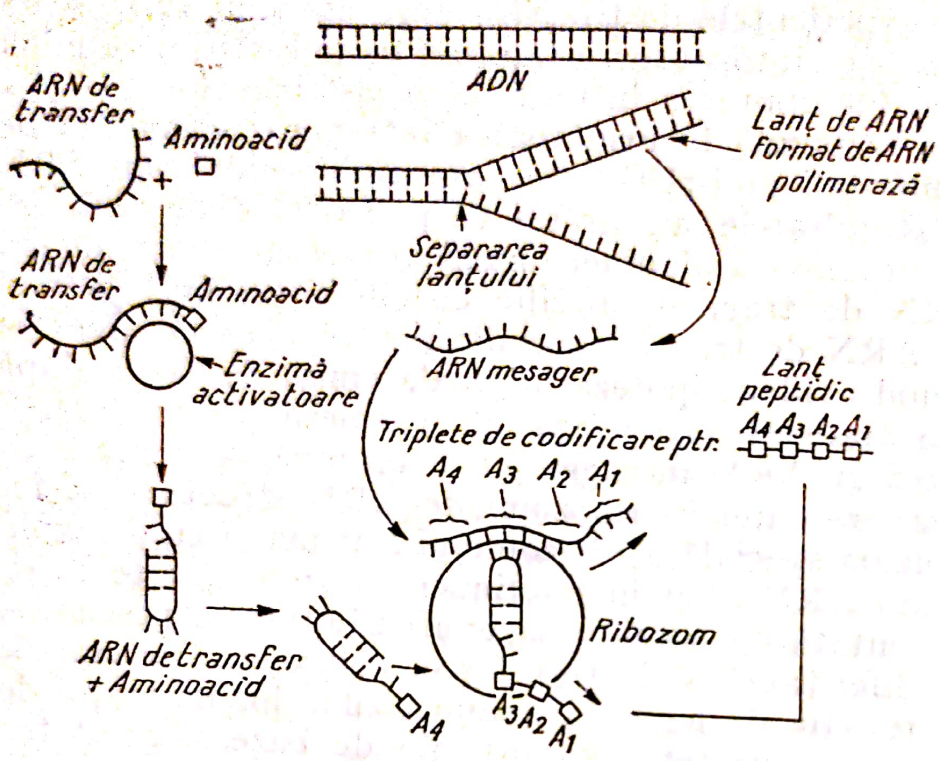


Fig. 12.5. Reprezentare schematică a sintezei proteice.

Desenele în formă de scară reprezintă acizi nucleici dublu catenari, ale căror baze sînt figurate prin liniile scurte perpendiculare. Unele părți ale schemei sînt încă ipotetice. Astfel, de exemplu, nu este sigur că ARN mesager este sintetizat printr-un proces absolut analog celui al duplicării ADN. De asemenea, amănuntele funcției ribozomului și modul în care ARN mesager se leagă de ribozom pentru a funcționa ca „matrice" rămîn încă necunoscute (modificat după Rich, 1962 și Watson, 1963).

să aibă o structură complexă, deși este încă greu de imaginat ce funcție ar putea reveni ARN structural ribozomal.

Figura 12.5 ilustrează și rezumă întreg mecanismul discutat mai sus.

ÎNFĂȘURAREA LANȚULUI PEPTIDIC DUPĂ PĂRĂSIREA RIBOZOMULUI

Ne rămîne de examinat o ultimă problemă. Este oare secvența aminoacizilor condiția necesară și suficientă pentru ca lanțul peptidic să sufere înfășurarea specifică în vederea formării unei proteine? Argumentul clasic invocat împotriva acestei ipoteze recurge la ireversibilitatea denaturării proteinei. O dată ce proteinele au fost desfășurate și structura lor tridimensională a fost distrusă, ele nu pot redobîndi decît rareori forma originară,

Scanned with OKEN Scanner

chiar dacă ordinea liniară a aminoacizilor este păstrată. Acest argument este combătut de regulă în două moduri. În primul rînd, aşa cum am văzut, proteinele sînt sintetizate serial începînd de la un capăt. Este puţin probabil ca înfăşurarea capătului liber, chiar dacă ea nu este controlată de structura ribozomului, să se producă la fel cu înfăşurarea la care s-ar ajunge dacă întreg lanţul peptidic întins ar fi liberat dintr-o dată ca atare în mediu. Cu alte cuvinte, este de bănuit că înfăşurarea specifică de la nivelul primei porţiuni va controla şi modul în care se înfăşoară restul moleculei. În al doilea rînd, există azi dovezi directe care arată că lanţul peptidic al ribonucleazei poate fi desfăşurat şi reînfăşurat astfel încît să adopte din nou configuraţia iniţială.

Dacă cele patru punţi S-S care există în această enzimă sînt rupte toate (prin reducere chimică), molecula pierde activitatea sa biologică şi lanţurile se desfăşoară. Dacă se restabilesc condiţiile ce permit refacerea punţilor (adică se revine de la condiţii reducătoare la altele oxidante), această refacere se produce la întîmplare, diferitele porţiuni ale lanţului reasamblîndu-se greşit. Structura terţiară a moleculelor ce conţin punţi anormale este mai stabilă decît forma nativă. Dacă însă se realizează şi se menţin condiţii corespunzătoare de oxidoreducere şi există un disponibil de grupări SH libere care să permită o desfacere şi refacere continuă a legăturilor S-S, molecula este capabilă — dacă ne putem exprima astfel — să încerce din nou să-şi reconstituie punţi corecte. În acest mod, printr-un proces de corectare a erorii, ea poate să redobîndească forma şi activitatea sa biologică specifică.

Prin urmare, pare raţional să admitem că ordinea aminoacizilor determină structura tridimensională cea mai stabilă a unei proteine şi că condiţiile din cursul sintezei proteice sînt cele care permit moleculei să adopte această formă. Nu este necesar să postulăm nici un mecanism special de control celular în afara determinării secvenţei guvernate de ARN mesager.

Dacă provocăm o modificare oarecare a structurii primare a unei proteine constatăm oare imediat apariţia unei noi structuri stabile? Deocamdată nu ştim încă în ce măsură înlocuirea aminoacizilor (spre exemplu, în urma unor mutaţii) afectează şi conformaţia tridimensională a proteinei. O comparare a secvenţelor de aminoacizi din lanţurile α şi β ale hemoglobinei şi din mioglobină (tabelul 11.1), care au toate structuri tridimensionale

Scanned with OKEN Scanner

foarte asemănătoare (fig. 3.11 și 3.13) arată că numărul locurilor în care se găsesc aminoacizii identici este relativ mic. Acest lucru nu înseamnă, bineînțeles, că în aceste proteine orice aminoacid poate fi substituit cu altul la întîmplare, fără ca aceasta să ducă la o modificare radicală a structurii. Nu sînt posibile decît anumite substituții și va fi foarte interesant de descoperit care sînt acestea și ce legi le guvernează.

Desigur, nu toate structurile părăsesc ribozomul într-o formă completă și activă. În multe cazuri, enzimele apar într-o formă inactivă (spre exemplu, tripsinogenul — vezi cap. 4) și necesită modificări chimice suplimentare pentru a deveni active. În proteine se mai găsesc adesea polizaharizi, lipide, metale și alte substanțe, și este probabil că legarea acestora de proteine se produce, după ce aceasta a părăsit ribozomul, fie sub acțiunea unor enzime, fie prin formarea spontană de complexe specifice.

O caracteristică a celulelor vii o constituie faptul că multe dintre cele mai complexe funcții celulare au loc în structuri superior organizate. Un exemplu în acest sens este modul de aranjare a enzimelor în membranele mitocondriale (cap. 6). Cum își fac apariția aceste structuri supramoleculare? Trebuie oare să postulăm intervenția unui factor organizator suplimentar care leagă proteinele și alte structuri laolaltă? Atunci cînd am examinat sinteza VMT în celula infectată (cap. 4) am văzut că, în condiții corespunzătoare, se pot forma spontan structuri destul de complexe. Nu avem însă deocamdată decît cunoștințe foarte aproximative asupra modului în care enzimele ajung să fie amplasate în locurile corespunzătoare din celule sau, spre exemplu, asupra coordonării amănunțite a procesului de diviziune celulară.

Acestea reprezintă o parte din problemele ce rămîn în mare măsură nerezolvate și care se adaugă la problemele cruciale expuse în cap. 10 privind modul în care este controlat ritmul de sinteză a diferitelor proteine în cursul creșterii și diferențierii organismelor superioare.

Scanned with OKEN Scanner

Anexa 1

TEHNICA DIFRACȚIEI CU RAZE X

Cea mai importantă dintre tehnicile care ne stau la dispoziție pentru studiul detaliilor tridimensionale, atît ale moleculelor mici, cît și ale celor mari, este cea a difracției cu raze X. Razele X, undele luminoase și radioundele sînt — toate — radiații electromagnetice și, cînd analizăm proprietățile lor ondulatorii (ceea ce facem de fapt atunci cînd discutăm efecte de difracție), putem considera aceste unde ca fiind generate de către un flux oscilant de electroni. Radioundele sînt produse de către curenți alternativi care circulă în antena de emisie, iar undele luminoase și razele X, care au o lungime de undă mult mai scurtă, sînt produse de oscilațiile electronilor din interiorul atomilor și moleculelor, excitate prin încălzire sau prin alte mijloace.

Cînd razele X traversează un corp, electronii acestuia sînt puși în oscilație de către undele electromagnetice care traversează corpul și devin surse secundare de raze X. În fig. *A*. 1 razele X incidente (provenite dintr-o sursă aflată în afara imaginii, la stînga acesteia) interacționează cu un șir ordonat de centri de împrăștiere (electroni sau regiuni cu densitate mare de electroni). Acești centri funcționează ca surse secundare de raze X împrăștiate, care extrag o parte din energia fasciculului de raze X transmis și o iradiază din nou. Pentru aceste raze X împrăștiate vor exista unele direcții, după anumite unghiuri, în lungul cărora undele provenite de la toți centrii de împrăștiere din șir sînt în fază și se întăresc unele pe altele. Dacă θ este unghiul dintre fasciculul incident și un plan perpendicular pe șirul de centri de împrăștiere, unghiul pe care fasciculul împrăștiat îl va face cu acest plan (ϕ) este determinat de către lungimea de undă a

razelor X (λ) şi de distanţa dintre centrii de împrăştiere (d) în conformitate cu relaţia :

$$n\lambda = d \sin \theta + d \sin \phi,$$

unde $n = 1, 2, 3 \ldots$ etc. (fig. *A*. 1).

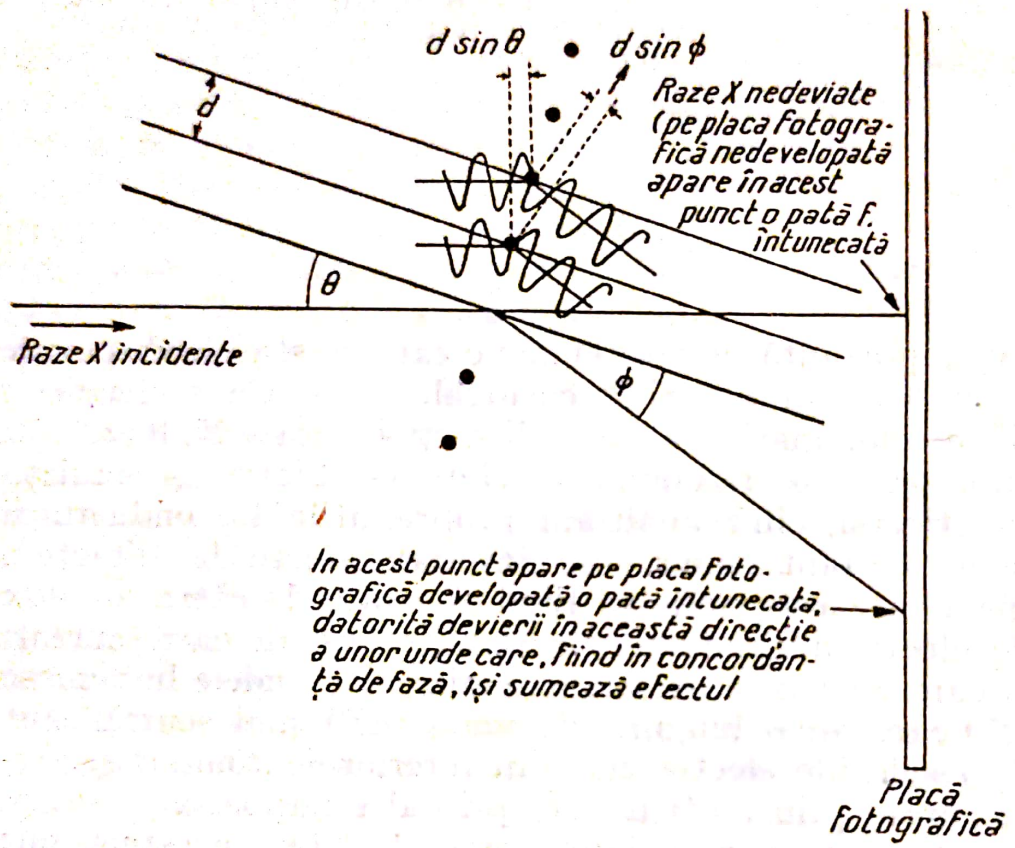


Fig. A.1. Ilustrarea interacţiunii dintre fasciculul incident de raze X care îşi au originea într-o sursă în stînga figurii şi un şir de centri de difracţie (electroni individuali sau regiuni cu o densitate mare de electroni).

Centrii de difracţie sînt reprezentaţi prin puncte, separate între ele prin distanţa d, iar unghiul dintre fasciculul incident şi planul perpendicular pe şirul de centri de difracţie este notat cu θ. În studiile de difracţie se utilizează un fascicul îngust de raze X incidente, astfel încît majoritatea razelor nedeviate formează o pată foarte întunecată pe placa fotografică în dreapta desenului. Fiecare centru de difracţie acţionează ca o sursă secundară de raze X. Undele ce iradiază de la fiecare centru de difracţie respectă o simetrie sferică, iar interferenţa care se produce între aceste unde face ca împrăştierea globală să nu aibă o simetrie sferică. În anumite direcţii, razele plecate de la fiecare sursă secundară se află în concordanţă de fază şi se sumează, astfel încît după developarea plăcii fotografice apar pe ea şi alte pete întunecate. Unghiul (Φ) dintre oricare din aceste direcţii şi planul perpendicular faţă de şirul de centri de difracţie trebuie să aibă o astfel de valoare, încît lungimea distanţei notate $d \sin \theta + d \sin \Phi$ să fie un număr întreg de lungimi de undă (reprezentate ca o singură lungime de undă).

Considerînd acum nu un şir, ci o reţea tridimensională de centri de împrăştiere dispuşi în plan aflaţi la distanţa d unul de altul, condiţia ca undele împrăştiate de către centrii unui singur

Scanned with OKEN Scanner

plan să fie în fază este condiţia de reflexie $\theta = \phi$ (unghiul de incidenţă să fie egal cu unghiul de reflexie). Undele provenite de la toţi centrii din toate planele vor fi în fază dacă reţeaua este orientată astfel, încît unghiul θ dintre plane şi fasciculul incident să satisfacă condiţia Bragg:

$$n\,\lambda = 2d \sin \theta.$$

Această ecuaţie este dedusă din cea de mai sus în care ϕ este acum egal cu θ. Dacă condiţia Bragg este satisfăcută, undele provenite de la toţi centrii de împrăştiere vor fi în fază, indiferent de distribuţia centrilor în fiecare plan al reţelei.

Datorită aşezării periodice a moleculelor într-un cristal, există o mare varietate de sisteme de plane cu densitate de electroni relativ mare, dispuse în mod regulat. Dacă cristalul traversat de un fascicul îngust de raze X monocromatice este rotit astfel, încît aceste sisteme de plane să facă pe rînd unghiul corect cu fasciculul incident şi se expune timp suficient o placă fotografică aşezată înapoia cristalului, va apărea (după developare) o zonă întunecată în centrul plăcii, datorită razelor X nedeviate; placa developată mai prezintă, de asemenea, un sistem de pete corespunzătoare împrăştierii în direcţiile ale căror unghiuri satisfac ultima ecuaţie. Figuri asemănătoare pot fi obţinute fără rotarea probei dacă aceasta constă dintr-o pudră de cristale fine sau dintr-o fibră naturală conţinînd numeroase mici regiuni cristaline orientate la întîmplare faţă de fasciculul incident. Măsurarea unui număr suficient de unghiuri de împrăştiere (presupunînd cunoscută lungimea de undă a razelor X) permite determinarea mărimii şi formei *celulei primitive* sau a grupului care se repetă periodic în cristal. Acest grup conţine o singură moleculă, în cazul în care toate moleculele cristalului sînt orientate în acelaşi fel sau, de exemplu, o pereche de molecule, cînd moleculele sînt orientate alternativ în direcţii diferite.

Cu ajutorul razelor X se pot obţine sisteme de pete într-o gamă largă de unghiuri, deoarece lungimile de undă ale acestor raze sînt comparabile cu distanţele la care se repetă moleculele (de la 1 Å pînă la 100 Å, respectiv de 0,1 mμ pînă la 10 mμ). Sisteme asemănătoare pot fi obţinute, de asemenea, cu ajutorul luminii vizibile monocromatice în cazul structurilor repetitive în care distanţa (d) este comparabilă cu lungimea de undă a luminii. Efectele de acest fel — în care se manifestă natura ondulatorie a radiaţiilor şi care nu pot fi explicate în cadrul concepţiei

propagării în linie dreaptă a radiațiilor — sînt denumite efecte de difracție, iar figurile produse în acest fel de către cristale se numesc *spectre de difracție*.

Intensitatea unei pete corespunzătoare unui unghi anumit dintr-un spectru de difracție cu raze X este determinată de interacțiunea dintre undele împrăștiate de către mai multe sisteme de plane paralele cu densități electronice diferite, de la diferite niveluri din celula primitivă. În consecință, studiul intensității petelor ne poate furniza informații asupra distribuției electronilor în celula primitivă. Folosind puteri separatoare scăzute, nu se pot localiza decît regiunile principale cu densitate electronică ridicată ; în cazul proteinelor, acestea sînt structurile axiale ale lanțurilor peptidice, precum și atomii cu număr atomic relativ ridicat, cum ar fi atomii de fier ai hemoglobinei. Dacă analiza este împinsă pînă la un grad de separare mai avansat, se ajunge la determinarea mai precisă a regiunilor cu densitate înaltă ; de asemenea, poate fi studiat ceea ce ține de regiunile cu densitate electronică mai mică din celula primitivă, reușindu-se ca, la o putere separatoare destul de înaintată, să se poată localiza individual atomii cu număr atomic mai scăzut. Cu cît molecula este mai mare și cu cît gradul de separare dorit este mai avansat, cu atît numărul de sisteme de plane ce trebuie să fie incluse în analiză pentru fiecare pată din figură crește.

Dificultățile de interpretare a spectrelor de difracție cu raze X sînt generate de faptul că, pentru fiecare punct dat din figură, nu poate fi măsurată decît intensitatea finală a petei. Amplitudinile și relațiile de fază ale undelor împrăștiate, care s-au combinat pentru a da unda de intensitatea celei observate, nu sînt cunoscute. Dacă, plecînd de la experiențe făcute pe modele sau de la alte surse de informație, se poate sugera o structură posibilă a moleculei din cadrul unui cristal, devine relativ ușor să se calculeze spectrul de difracție pe care l-ar produce această structură și să se confrunte intensitățile calculate cu figura obținută experimental. O asemenea comparație va putea eventual să sugereze căile de modificare a modelului în vederea obținerii unei corespondențe mai exacte.

Atunci cînd extragem direct informația conținută într-un spectru de difracție, putem folosi o serie de artificii tehnice menite să ușureze determinarea relațiilor de bază dintre undele

Scanned with OKEN Scanner

provenite de la diferitele sisteme de plane de împrăştiere. Atomii cu număr atomic relativ ridicat, cum sînt atomii de fier ai hemoglobinei sau alţi atomi ce pot fi adăugaţi moleculelor proteice în poziţii specifice, facilitează extrem de mult această analiză, dat fiind că ei împrăştie razele X mai energic decît carbonul, azotul sau oxigenul, ca urmare a densităţii lor electronice mai mari şi servesc de aceea ca punct de reper (a se compara cu puterea lor mai mare de împrăştiere a electronilor, discutată în anexa 4). Atomii de hidrogen, avînd un singur electron, împrăştie razele X atît de slab, încît localizarea lor cu ajutorul tehnicii difracţiei cu raze X este dificilă chiar la structurile foarte simple.

În cazul unei analize încununate de succes, informaţia conţinută în spectrele de difracţie poate fi prelucrată, construindu-se o hartă tridimensională a liniilor de densitate electronică constantă din celula primitivă (sinteză Fourier). În sintezele Fourier pentru mioglobină şi hemoglobină, zonele α-elicoidale ale structurilor axiale peptidice reprezintă regiuni cu densitate electronică relativ înaltă, pe asemenea hărţi tridimensionale fiind posibilă urmărirea traseului lanţului peptidic (structura terţiară). Acesta este procedeul prin care Kendrew, Perutz şi colaboratorii lor şi-au construit modelele reprezentate în fig. 3.11 şi 3.13. Aceste două proteine au fost primele care au fost analizate într-un mod atît de amănunţit, dar între timp s-a înaintat mult şi în studiul altor proteine. Una dintre principalele dificultăţi ivite în studiul multor proteine este aceea de a reuşi fixarea a cel puţin unul sau doi atomi grei (în puncte diferite ale moleculei), ce urmează să servească drept puncte de reper. De asemenea, în cazul proteinelor mai sărace în zone cu structură α-elicoidală decît mioglobina şi hemoglobina, este mai greu să se determine, pe hărţile de densitate electronică, traseul lanţurilor peptidice.

Petele dintr-un spectru de difracţie cu raze X sînt datorite efectelor de interferenţă dintre undele împrăştiate de atomii materialului traversat de fasciculul de raze X. O astfel de figură nu poate apărea decît dacă în structura examinată există o repetare a unei anumite unităţi; ca atare, prima condiţie pentru efectuarea cercetărilor de difracţie cu raze X este cea a orientării sau alinierii regulate a moleculelor materialului analizat. În fibrele proteice naturale, cum sînt părul şi lîna, moleculele individuale sînt întrucîtva aliniate şi regularitatea alinierii poate

Scanned with OKEN Scanner

fi adesea ameliorată prin întinderea fibrei. Moleculele lungi, cum ar fi cele de ADN (cap. 9) și VMT (cap. 4), formează geluri cu molecule aliniate sau care pot fi aliniate prin tragerea lor în fire. Cu cît alinierea este mai accentuată, sau—în cazul cristalelor—cu cît un cristal este mai mare, cu atît petele spectrului de difracție vor fi mai fine. (În cazul unei rețele mai mari de centri de împrăștiere, efectele de interferență dau naștere unui fascicul de difracție mai îngust). Un cristal foarte mic, sau o fibră în care moleculele sînt mai puțin perfect aliniate, produc un spectru de difracție format din pete largi sau arcuri (fig. 3.14) care furnizează mai puține informații decît figurile produse de cristale mai mari (fig. 3.16).

În studiul virusurilor, simetria figurii poate da informații utile, chiar dacă spectrul nu este prea detaliat (cap. 4) ; în cazul VMT, pentru a obține imaginea distribuției radiare a densității electronice (fig. 4.1), este suficientă o analiză mai sumară decît cea necesară pentru construirea unei hărți tridimensionale de densități electronice. Chiar și spectrele de difracție de tipul celor obținute cu proteine fibroase (fig. 3.14), care pun în evidență numai cîteva din interdistanțele nucleelor—pe cele mai importante—,pot fi utile pentru a decide între diferitele modele posibile ale structurii secundare a proteinei. După cum s-a arătat în cap. 3, prezența într-o anumită proteină a unei distanțe interatomice de 5—5,5 Å arată că lanțul peptidic nu poate fi complet desfășurat, cel puțin pe cea mai mare parte a lui.

O fibră proteică conține anumite regiuni în care moleculele sînt aliniate în mod ordonat. În alte porțiuni, aranjamentul lor este mult mai dezordonat. În aceste condiții, studiile cu raze X furnizează informații numai asupra regiunilor mai ordonate. Aceeași limitare este valabilă, în general, pentru alte materiale biologice necristaline sau parțial cristaline, cum ar fi teaca de mielină a nervilor, în care există un grad de aliniere moleculară suficient pentru a da un spectru de difracție cu raze X, fără a exista însă ordinea riguroasă caracteristică cristalelor. Este posibil ca în astfel de materiale, accesibile cercetărilor prin metoda difracției cu raze X, zonele mai ordonate să constituie mai puțin decît jumătate din întregul material; s-ar putea ca, în unele cazuri, aceste regiuni să constituie chiar, față de întreaga structură, partea cea mai puțin importantă din punctul de vedere al funcției biologice.

Scanned with OKEN Scanner

LEGĂTURI DE HIDROGEN. STRUCTURA ATOMICĂ ŞI SUBMOLECULARĂ

Legăturile de hidrogen joacă un rol important în structura proteinelor şi a acizilor nucleici. În anexa de faţă vom discuta natura acestor legături în măsura în care o putem face în termeni descriptivi şi nematematici. În acelaşi timp, vom încerca să relevăm, în general, limitările legate de abordarea descriptivă folosită în tot cursul textului principal al acestei cărţi, în care structurile moleculare şi interacţiunile dintre grupele moleculare sînt ilustrate prin desene ale modelelor moleculare.

Pentru discutarea multor aspecte ale comportării moleculare, această prezentare descriptivă este cu totul adecvată. În anumite cazuri însă, ea devine mai puţin potrivită sau, uneori, cu totul neadecvată; ca atare, în textul principal am evitat pur şi simplu să intrăm în tratarea anumitor subiecte pînă la acest grad de amănunţime. Cititorul cu spirit critic va fi de aceea interesat să afle care sînt locurile în care discuţia noastră a fost limitată în felul acesta şi să dobîndească unele noţiuni asupra metodelor folosite şi asupra problemelor ce se ivesc cu ocazia unei tratări mai amănunţite. În această anexă, scopul nostru este acela de a indica în ce mod aspectele mai generale ale comportării moleculelor mari, discutate în textul principal, sînt determinate de proprietăţile fundamentale ale atomilor şi moleculelor şi de cîmpurile de forţe ale electronilor şi nucleelor atomice.

Trebuie subliniat aici că diagramele structurii atomilor sau reprezentările noastre asupra atomilor, bazate în cea mai mare parte pe ilustraţii de popularizare, reprezintă numai anumite faţete ale detaliilor atomice. Electronii şi nucleele atomilor nu se comportă în acelaşi mod cu obiectele de dimensiuni mai mari pe care se bazează limbajul şi imaginile noastre vizuale.

Scanned with OKEN Scanner

Nici una din reprezentările electronului sau ale nucleelor atomice nu cuprinde toate aspectele comportării lor, iar alegerea imaginii celei mai adecvate depinde de tipul de experienţă sau de fenomenul atomic a cărui discutare ne interesează.

În majoritatea proceselor biologice sau biochimice nu avem de-a face cu interacţiuni nucleare şi putem reprezenta nucleele atomice sub forma unor puncte situate în centrul fiecărui atom. O altă simplificare se naşte din convenţia clasică de a se considera nucleele atomice ca fiind „încărcate pozitiv" şi electronii „încărcaţi negativ". Aceasta permite o descriere simplă şi clară a forţei de atracţie dintre nucleele atomice şi electroni şi a forţei de repulsie dintre electroni, cu condiţia ca aceste entităţi subatomice să nu se apropie prea mult una de cealaltă. Interacţiunile dintre molecule, ca şi cele dintre diferitele părţi ale unei molecule mari pot fi descrise cu destul de mare acurateţă în termeni electrostatici.

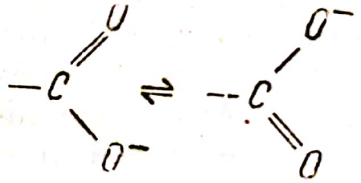
În cazul distanţelor mici ce predomină *în interiorul* moleculelor mici, sau în interiorul grupelor moleculare ale unei molecule mari, interacţiunile dintre electroni şi nucleele atomice devin mai complexe. Amănuntele distribuţiei electronilor în interiorul atomilor şi al moleculelor pot fi descrise în mod adecvat numai cu ajutorul unei ramuri a matematicii, cunoscută sub numele de mecanică ondulatorie. Nu mai este corect ca electronii din interiorul atomilor şi al moleculelor să fie consideraţi ca particule. Pentru scopul urmărit de noi, electronii din interiorul moleculelor ar putea fi imaginaţi cel mult sub forma unui nor de sarcină negativă ce se roteşte în jurul nucleelor atomice şi umple spaţiul din interiorul atomului.

Cu toate acestea însă, limita exterioară a norului electronic care defineşte volumul unui atom sau al unei molecule poate fi pusă în evidenţă cu destulă precizie. Atunci cînd doi atomi se apropie unul de altul, pe măsură ce norii lor electronici se întrepătrund intră în acţiune puternice forţe de repulsie. Dacă se poate produce o redistribuire satisfăcătoare a electronilor, forţa de repulsie poate fi învinsă de către o forţă de atracţie pe măsură ce norii electronici se întrepătrund dînd naştere unei legături chimice *covalente*. Dacă nu se formează legături chimice, forţa de repulsie se opune unei întrepătrunderi cît de cît accentuate. Măsurarea distanţelor dintre moleculele mici din cristale (mult studiată prin difracţia cu raze X, înce-

Scanned with OKEN Scanner

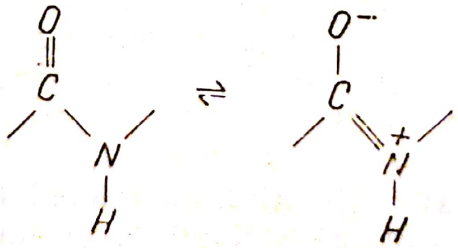
pînd cu perioada anilor 1920) a permis trasarea cu precizie a limitelor exterioare ale atomilor constituenţi, adică a limitelor norului electronic. Această limită exterioară este cea ilustrată în desenele moleculare din această carte. În realitate, limita nu este chiar atît de netă cum o sugerează desenele, dar modelele moleculare după care s-au făcut aceste desene permit o reprezentare foarte sugestivă a proprietăţilor *sterice* (spaţiale sau de umplere a spaţiului) ale grupelor moleculare.

Vom lua acum în consideraţie distribuţia de sarcini (electroni) dintr-un lanţ peptidic, ilustrată în fig. 3.1. prin semnele + şi —. Deşi, după cum se poate aprecia din cele deja arătate, singura cale adecvată pentru discutarea acestei probleme ar fi cea matematică, se poate apela pentru descrierea acestor stări la conceptul *rezonanţei* intramoleculare. Un exemplu simplu pentru ilustrarea acestei idei este reprezentat de grupul carboxil ionizat ($-COO^-$). În realitate, acest grup este simetric, avînd o singură unitate de sarcină negativă egal distribuită între cei doi oxigeni. Această situaţie nu poate fi însă reprezentată prin formulele chimice convenţionale şi, dacă dorim să folosim asemenea formule, trebuie să ne închipuim că grupul se află în rezonanţă între două forme:



Ne putem imagina că grupul îşi petrece cîte o jumătate din timp în fiecare dintre aceste forme.

În mod similar, structura axială peptidică poate fi reprezentată şi ea în două forme:



În studiul lor amănunţit asupra distanţelor dintre atomi în cristalele peptidelor mici (cap. 3), Pauling şi Corey au găsit că în acest grup distanţa C—N era intermediară între distan-

Scanned with OKEN Scanner

ţele caracteristice pentru legăturile simple ş duble. Ei au arătat că acest caracter de dublă legătură parţială al legăturii C—N împiedică rotaţia liberă în jurul acestei legături şi face ca atomii respectivi de C, O, N şi H să se menţină toţi într-un singur plan. Pe baza lungimii legăturii C—N, ei au dedus că în cadrul acestei imagini simple de rezonanţă grupul ar trebui să se găsească cu puţin peste o treime din timp în forma încărcată. Cu alte cuvinte, părăsind acum imaginea suprasimplificată a rezonanţei, electronii din interiorul grupului structurii axiale peptidice sînt astfel distribuiţi, încît norul electronic este întrucîtva atras către atomul de oxigen, care ajunge astfel să fie înzestrat cu o sarcină negativă liberă de mai puţin decît o jumătate de unitate. Această sarcină este luată de la atomii de azot şi hidrogen, care rămîn astfel cu o sarcină pozitivă corespunzătoare (unitate atomică de sarcină = sarcina unui electron).

Formarea legăturilor de hidrogen este întotdeauna rezultatul îndepărtării unor electroni de pe atomul de hidrogen, care rămîne astfel cu o sarcină pozitivă netă şi este atras către regiunea încărcată negativ a unui atom de oxigen sau azot dintr-o moleculă învecinată. Legătura de hidrogen dintre moleculele de apă este ilustrată în fig. *A*.2. Atomii de hidrogen ai unei molecule de apă sînt purtătorii unei sarcini pozitive libere mici, rezultat al electronegativităţii atomului de oxigen (adică al puterii lui de a capta un electron). Atomii de hidrogen formează legături de hidrogen cu atomii de oxigen ai moleculelor învecinate.

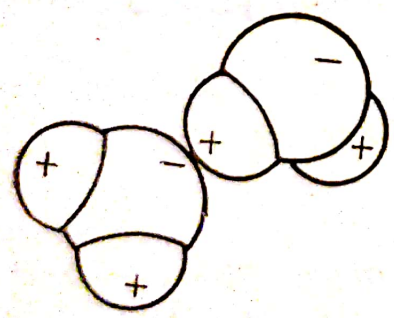
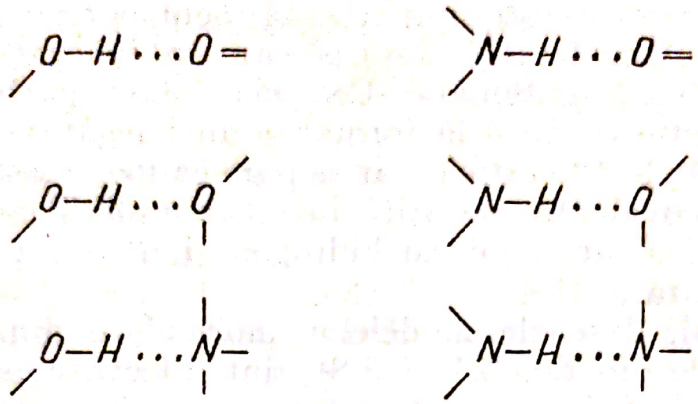


Fig. A.2. Legătură de hidrogen între molecule de apă.

(Această forţă de atracţie dintre moleculele de apă este cea care duce la căldura latentă ridicată şi la tensiunea superficială înaltă a apei, deoarece este necesară o cantitate relativ mare de energie pentru a despărţi o moleculă de apă de vecinele ei). Alte tipuri de legături de hidrogen sînt redate în tabelul *A*.2.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL A. 2
Diferite tipuri de legături de hidrogen



În contrast cu grupările —OH şi —NH, grupările —CH nu formează legături de hidrogen. Valorile electronegativităţii atomilor de carbon şi hidrogen sînt destul de apropiate, ceea ce face ca electronii să nu fie extraşi din atomul de hidrogen, aşa cum se întîmplă în cazul grupărilor —OH şi —NH. (Nucleele atomilor de oxigen şi azot ce poartă sarcini pozitive de, respectiv, +8 şi +7 au o putere de extragere a electronilor mai mare decît nucleele carbonului care poartă o încărcătură pozitivă de +6.)

Simpla existenţă a acestei diferenţe între atomii de carbon, pe de o parte, şi atomii de oxigen şi azot, pe de alta, are consecinţe profunde. Cum grupările —CH nu pot forma legături de hidrogen, pătrunderea lanţurilor hidrocarbonice în apă se face cu dificultate. Pentru a pătrunde, ele trebuie să rupă legăturile apă-apă, fără a se putea forma în schimb vreun fel comparabil de legături între moleculele de apă şi grupările hidrocarbonice. Lanţurile hidrocarbonice sînt de aceea *hidrofobe* („fug de apă"), iar grăsimile şi uleiurile sînt practic insolubile în apă. Pe de altă parte, molecule de tipul alcoolului metilic şi etilic sînt uşor miscibile cu apa, deoarece poartă o legătură de hidrogen sau grupare —OH *hidrofilă* („iubitoare de apă") ce poate forma legături de hidrogen cu moleculele de apă. Grupările ce formează legături de hidrogen sînt denumite în genere grupări *polare* (din cauza momentului electric dipolar). Efectele hidrofobe sînt importante pentru determinarea amănuntelor structurale ale proteinelor şi acizilor nucleici (vezi ultimele paragrafe din cap. 3 şi cap. 9) şi aceste elemente sînt relevante şi pentru discutarea structurii şi permeabilităţii membranei (cap. 6).

Scanned with OKEN Scanner

Desenul din fig. 3.1, avînd specificate pe el semnele + şi —, constituie deci o reprezentare corespunzătoare a formei moleculei şi a acelei părţi din distribuţia electronilor în interiorul moleculei care este importantă pentru formarea legăturii de hidrogen ; o problemă minoră pe care am ignorat-o pînă acum ar trebui totuşi menţionată. Cea mai mare parte (90%) din forţa de atracţie ce duce la formarea unei legături de hidrogen este de natură electrostatică, dar se pare că mai există şi o mică componentă covalentă, datorită întrepătrunderii parţiale a norilor electronici ai atomilor de hidrogen şi oxigen între care s-a stabilit legătura.

În general, desenele modelelor moleculare din cap. 3, 4, 6 şi 9 (ca şi cele din fig. 3.1 şi 3.8) sînt adecvate pentru înfăţişarea structurii fizice a proteinelor, a membranelor lipidice, a acizilor nucleici şi a nucleoproteinelor, întrucît aceste structuri sînt determinate mai ales de către legăturile de hidrogen, efectele sterice şi atracţiile şi repulsiile dintre grupările ionice (de exemplu, $-COO^-$ sau $-NH_3^+$). Dacă am cunoaşte structura detaliată a zonei active dintr-o enzimă, desenele de acest fel ar putea fi utile pentru a ilustra legarea iniţială a substratului. Aceste desene devin însă cu totul nepotrivite în momentul în care analizăm detalii ale modificărilor chimice, respectiv redistribuirea de electroni în molecula de substrat, ce are ca urmare clivarea acesteia de către enzimă. Studiul mecanismului de acţiune a enzimei este, într-un fel, o problemă de biologie submoleculară.

Vom încheia această anexă cu unele date asupra modului în care sînt reprezentate grupările acide şi bazice în desenele modelelor moleculare din această carte, precum şi o scurtă definiţie a noţiunilor de „*p*H" şi „*p*K".

În apa pură, protonii (nucleele atomilor de hidrogen) au tendinţa de a se deplasa de la o moleculă de apă la alta :

$$H_2O + H_2O \rightleftharpoons H_3^+O + OH^-.$$

Concentraţia ionilor H_3^+O în apă pură la 20 °C este de aproximativ 10^{-7} g ion per litru (*p*H ~ 7). Dacă se dizolvă în apă molecule purtătoare de grupări acide (de exemplu, —COOH), aceste grupări tind să transfere protoni moleculelor de apă :

$$-COOH + H_2O \rightleftharpoons -COO^- + H_3^+O$$

şi în consecinţă să mărească concentraţia ionilor de H_3O. O concentraţie a ionilor H_3^+O de 10^{-6} g ion per litru corespunde

Scanned with OKEN Scanner

unui pH de 6, 10^{-5} g ion per litru pH-ului 5 etc. Soluţiile acide au, aşadar, valori de pH mai joase decît pH 7.

Dacă se dizolvă în apă molecule cu grupări bazice (de exemplu, $-NH_2$), ele tind să capteze protoni:

$$-NH_2 + H_3^+O \rightleftharpoons -N^+H_3 + H_2O.$$

Astfel, bazele scad concentraţia ionilor H_3^+O. O concentraţie în ioni H_3^+O de 10^{-8} g ion per litru corespunde unui pH de 8 etc. Soluţiile alcaline au deci valori de pH mai înalte decît pH 7.

La pH ~ 7 grupările $-COOH$ şi $-NH_2$ sînt aproape toate în forma $-COO^-$ şi $-NH_3^+$, iar în desenele moleculare ce ilustrează această carte toate grupările au fost figurate aşa cum se află în soluţii apoase la pH ~ 7. Grupările $-COOH$ au un pK ~ 4, ceea ce înseamnă că pe măsură ce se ridică aciditatea unei soluţii de proteine, aceasta îndepărtîndu-se de pH ~ 7, proporţia de grupări $-COO^-$ ce vor fi regăsite în forma $-COOH$ creşte pînă în momentul în care pH-ul se apropie de pH ~ 4. La un pH egal cu valoarea pK, jumătate din aceste grupări vor fi ionizate. O dată cu scăderea pH-ului sub valoarea pK, o majoritate progresiv crescîndă a acestor grupări se va afla în forma neionizată.

Grupările NH_2 au un pK ~ 9; dacă o soluţie de proteină este adusă la un pH mai alcalin decît pH ~ 7, în zona de pH între 8 şi 10 o proporţie crescîndă a acestor grupări va trece în forma neionizată. Sarcina liberă a unei molecule de proteină depinde, aşadar, de pH; ea este pozitivă în soluţii suficient de acide şi negativă în soluţii suficient de alcaline. pH-ul la care o moleculă de proteină dată nu mai poartă nici o sarcină liberă defineşte punctul izoelectric al acestei proteine.

Deoarece pH-ul citoplasmei celulare şi al mediilor extracelulare rămîne aproape întotdeauna în limitele de pH cuprinse între 5 şi 8, desenele modelelor moleculare cu grupări acide şi bazice în formă ionizată redau reprezentarea corectă a stării moleculelor în condiţii fiziologice normale.

S-a folosit uneori în text termenul de „soluţie tampon". O soluţie tampon este o soluţie ce conţine un amestec al unui acid sau baze slabe cu sărurile lor respective, avînd rolul de a menţine pH-ul relativ constant în condiţiile adăugării unor cantităţi limitate de acizi sau baze. (Acizi şi baze slabe sînt acelea ale căror valori de pK se apropie de 7.)

Scanned with OKEN Scanner

Anexa 3

STABILITATEA α-HELIXULUI

Această anexă este concepută ca un fel de continuare a anexei 2. Ea cuprinde o serie de considerații asupra solidității legăturilor de hidrogen, analizînd de asemenea mai detaliat rolul acestora în determinarea structurii macromoleculelor, preocupare concretizată într-o discuție asupra încolăcirii unui lanț peptidic ce duce la formarea unui α-helix. Legăturile de hidrogen sînt legături slabe (1 pînă la 7 kcal/mol) în comparație cu legăturile covalente (15 pînă la 150 kcal/mol). Importanța lor în structura biomoleculelor rezidă tocmai în faptul că nu sînt mult mai puternice decît forțele de desfacere generate de agitația termică la 20—37 °C (~ 1 kcal/mol). Efectul aditiv al mai multor legături de hidrogen, într-o singură macromoleculă, poate duce la formarea unei structuri care, în anumite condiții, este stabilă la 37 °C. Totuși, modificări chiar neînsemnate ale acestor condiții, cum ar fi schimbarea concentrației ionilor de Mg^{++}, pot diminua stabilitatea structurii. După cum s-a arătat în cap. 9, moleculele biologice nu sînt rigide și imuabile, ci susceptibile de a suferi modificări discrete, chiar în condiții ce se încadrează în limitele normale, fiziologice.

În general, cu cît un atom de hidrogen al unui grup —NH sau —OH pierde mai mulți electroni, cu atît va fi mai solidă legătura de hidrogen pe care o formează. Tăria legăturilor de hidrogen dintre moleculele de apă a fost apreciată a fi de ~ 5 kcal/mol, iar legăturile de hidrogen formate de structurile axiale peptidice trebuie să fie ceva mai puternice decît aceasta (ca rezultat al efectelor de rezonanță discutate în anexa 2).

Analizînd efectele pe care legăturile de hidrogen din interiorul lanțului le au asupra stabilizării α-helixului, trebuie reamin-

Scanned with OKEN Scanner

tit faptul că atunci cînd într-un mediu apos un lanţ se înfăşoară pentru a forma o spirală, se formează legături de hidrogen intracatenare, dar se *rup* legăturile de hidrogen ce unesc grupările —HN şi =O ale structurii axiale cu moleculele de apă înconjurătoare (fig. A.3). În general, pentru lanţurile peptidice aflate în diferite soluţii, forma elicoidală încolăcită va fi mai favorabilă din punct de vedere energetic (şi de aceea va fi cea adoptată de moleculă) numai dacă forţa de atracţie a legăturilor intracatenare ale lanţului este mai puternică decît forţa de atracţie ce se exercită între grupările peptidice şi moleculele solventului.

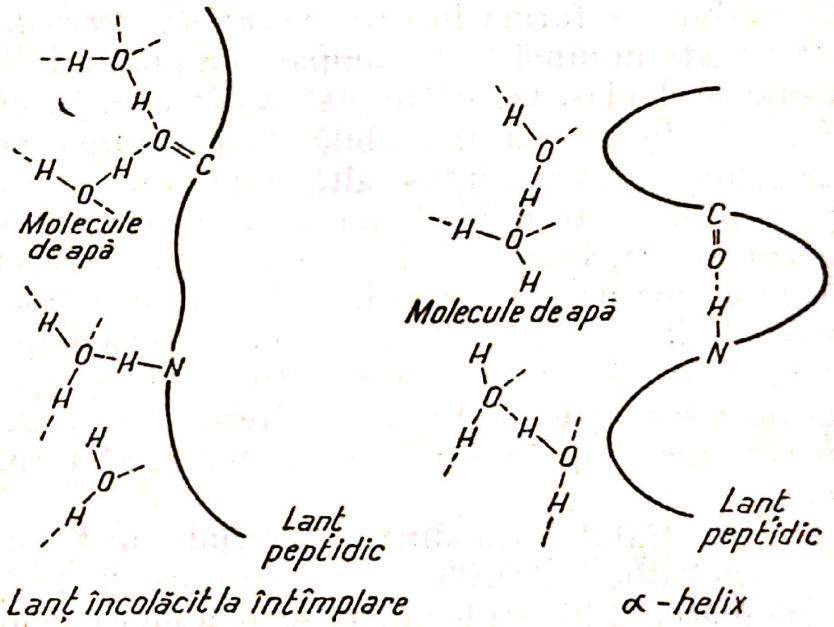


Fig. A.3. Schemă ilustrînd remanierea dispoziţiei legăturilor de hidrogen ce are loc atunci cînd un lanţ peptidic aflat în soluţie apoasă se înfăşoară într-un α-helix.

În soluţie apoasă, grupările care alcătuiesc structura axială a lanţului desfăşurat formează legături de hidrogen cu moleculele de apă.

În studiul peptidelor sintetice s-a observat, de exemplu, că α-helixurile sînt foarte stabile dacă sînt dizolvate în cloroform sau într-un alt solvent ce nu poate forma legături de hidrogen. În soluţie apoasă, soliditatea legăturilor de hidrogen intracatenare este atît de mare, încît ele conferă stabilitate periferiei α-helixului (după cum s-a arătat în cap. 3). Dacă unor soluţii apoase de peptide sau proteine li se adaugă uree, se observă că α-helixurile tind să se desfăşoare pe măsură ce creşte concentraţia ureei. Moleculele de uree formează legături de hidrogen ceva mai puternice decît moleculele de apă, ca

Scanned with OKEN Scanner

urmare a distribuirii electronilor (rezonanță) în molecula de uree, care este comparabilă cu cea din grupările structurii axiale peptidice. Prin desfășurare în soluții de uree, grupările din structura axială peptidică pot forma puternice legături de hidrogen cu moleculele de uree, ceea ce face ca și helixul să nu mai fie forma cea mai favorabilă din punct de vedere energetic. În aceasta constă mecanismul de denaturare a proteinelor în soluții de uree suficient de concentrate.

Discutarea procesului de înfășurare și desfășurare a α-helixului ne-a condus la o problemă de importanță fundamentală în biologia moleculară: un lanț molecular sau agregatul molecular ce alcătuiește un cromozom sau o membrană celulară va adopta acea formă care, din punct de vedere energetic, este cea mai favorabilă — forma în care *potențialul termodinamic* sau energia *liberă* este minimă (a se compara cu modul în care un sistem mecanic se deplasează către o stare de energie potențială minimă). Această formă va fi stabilă dacă energia necesară pentru ca molecula să treacă într-o altă formă este mai mare decît energia pe care o poate dobîndi temporar în condițiile agitației termice dezordonate. Dacă, pe de altă parte, diferențele dintre potențialele termodinamice proprii mai multor forme posibile sînt mai mici decît energia agitației termice sau comparabile cu aceasta, atunci lanțul sau agregatul molecular se va găsi o parte din timp în fiecare dintre aceste forme alternative, și anume cea mai mare parte din timp în forma cu potențialul termodinamic cel mai mic.

Potențialul termodinamic include atît energia internă (de atracție) din legăturile moleculare, cît și un termen de *entropie* care măsoară libertatea de mișcare a moleculelor. Să presupunem, de exemplu, că un lanț molecular ar fi capabil să se îndoaie în două moduri deosebite și că, în ambele forme, forțele de atracție sau energia internă a legăturilor ar fi aceleași. Dacă una dintre forme i-ar permite lanțului molecular mai multă libertate de mișcare, atunci aceasta va fi forma adoptată. Faptul este o consecință a acelei proprietăți fundamentale a materiei care este exprimată în principiul al doilea al termodinamicii: într-un sistem izolat entropia tinde întotdeauna să crească. Datorită agitației moleculare haotice, există o tendință către o dezordine și mai mare. Este perfect posibil ca o moleculă sau un agregat molecular să îmbrace o formă în care stabilitatea structurii este mai mică (datorită faptului că forțele de atracție se compensează

Scanned with OKEN Scanner

insuficient) dacă această formă permite în schimb o libertate mai mare de mişcare. În altă ordine de idei, un bilanţ de factori contrari determină uneori omul de ştiinţă să accepte un post cu un salariu mai mic de dragul unei libertăţi mai mari în activitatea de cercetare.

Noţiunea de potenţial termodinamic a fost introdusă pentru a putea lua în consideraţie contribuţiile relative ale energiei interne şi entropiei şi este astfel definită, încît condiţia de energie termodinamică potenţială minimă să corespundă formei de echilibru a sistemului. Variaţia de potenţial termodinamic ce însoţeşte o rearanjare oarecare (ΔG) este definită prin ecuaţia:

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S,$$

unde ΔE este variaţia energiei interne în această rearanjare;

ΔS — variaţia de entropie în rearanjare şi

T — temperatura absolută.

Un exemplu de calcul al potenţialului termodinamic pentru un caz particular este dat în anexa 5.

Într-o discuţie completă asupra factorilor ce determină un lanţ peptidic să se înfăşoare sau nu pentru a forma un α-helix trebuie să se ia în consideraţie şi pierderea libertăţii de mişcare ce rezultă în urma încolăcirii, precum şi libertatea mai mare dobîndită de moleculele de apă ce fuseseră legate anterior de grupările peptidice şi au fost puse în libertate prin formarea legăturilor de hidrogen intracatenare. Atracţiile electrostatice asociate cu legăturile de hidrogen intracatenare reprezentate în fig. 3.8 constituie astfel numai unul dintre factorii ce contribuie la stabilitatea α-helixului, libertatea mai mare a moleculelor de apă eliberate avînd poate o importanţă egală sau mai mare. (Libertatea de mişcare a moleculelor de apă este şi ea un factor important ce explică insolubilitatea, în soluţii apoase, a lanţurilor hidrocarbonice scurte. Lanţurile hidrocarbonice lungi sînt insolubile, deoarece inserţia lor în structura apei presupune ruperea unor legături de hidrogen; insolubilitatea lanţurilor hidrocarbonice scurte are o raţiune mai subtilă; ele restrîng libertatea de mişcare a moleculelor de apă înconjurătoare.)

Deşi, după cum am remarcat, energia internă a legăturilor de hidrogen intracatenare ale peptidelor este mai mare de

5 kcal/mol, s-a apreciat că variaţia potenţialului termodinamic per grup peptidic, atunci cînd lanţul se încolăceşte într-un mediu apos pentru a forma un α-helix, este de ~ 1,5 kcal/mol. Dacă se compară această valoare cu aceea pe care am atribuit-o forţei medii de disrupere prin agitaţie termică (~ 1 kcal/mol), se va constata că legăturile de hidrogen intracatenare conferă stabilitate numai periferiei α-helixului.

După cum s-a arătat în ultimele paragrafe ale cap. 3, interacţiunile dintre catenele laterale capătă importanţă în determinarea configuraţiei generale a unei molecule proteice.

Scanned with OKEN Scanner

FORMAREA IMAGINII DE CĂTRE ELECTRONI

În lămpile de radio, tuburile catodice (tuburi de televiziune) și microscoapele electronice, sursa de electroni este aceeași: un filament încălzit la incandescență. Electronii cu un grad suficient de energie termică scapă de pe suprafața filamentului, tot așa cum moleculele scapă de pe suprafața unui lichid în cursul evaporării.

În toate aceste trei dispozitive electronice — lămpi de radio, tuburi catodice și microscoape electronice — electronii emiși de pe suprafața filamentului sînt atrași și accelerați de către anodul încărcat pozitiv. În tubul catodic și în microscopul electronic, acești electroni deveniți rapizi trec printr-un orificiu din centrul anodului și ies din tub sub forma unui fascicul de electroni.

În toate aceste trei dispozitive electronii se deplasează într-un vid foarte accentuat, astfel încît ciocnirile cu moleculele de gaz sînt foarte rare. În aceste condiții, electronii se deplasează în linie dreaptă. Ei pot fi însă deviați fie prin cîmpuri electrice, fie prin cîmpuri magnetice. Lămpile de radio și tuburile catodice construite din sticlă sau metal sînt ermetic închise, aerul fiind evacuat din ele în cursul procesului de fabricație. Microscoapele electronice sînt închise ermetic în timpul funcționării și sînt conectate la pompe de vid.

În fig. *A*. 4, sursa de electroni (filament și anod) este figurată în partea de sus a coloanei de vid a unui microscop electronic. Fasciculul de electroni emis de această sursă coboară în axul coloanei, trecînd printr-o serie de bobine (lentile electronice). Aceste bobine și inelele lor metalice (piese polare) produc cîmpuri magnetice destinate să focalizeze fasciculul de electroni. Bobinele superioare (condensatori) concentrează

Scanned with OKEN Scanner

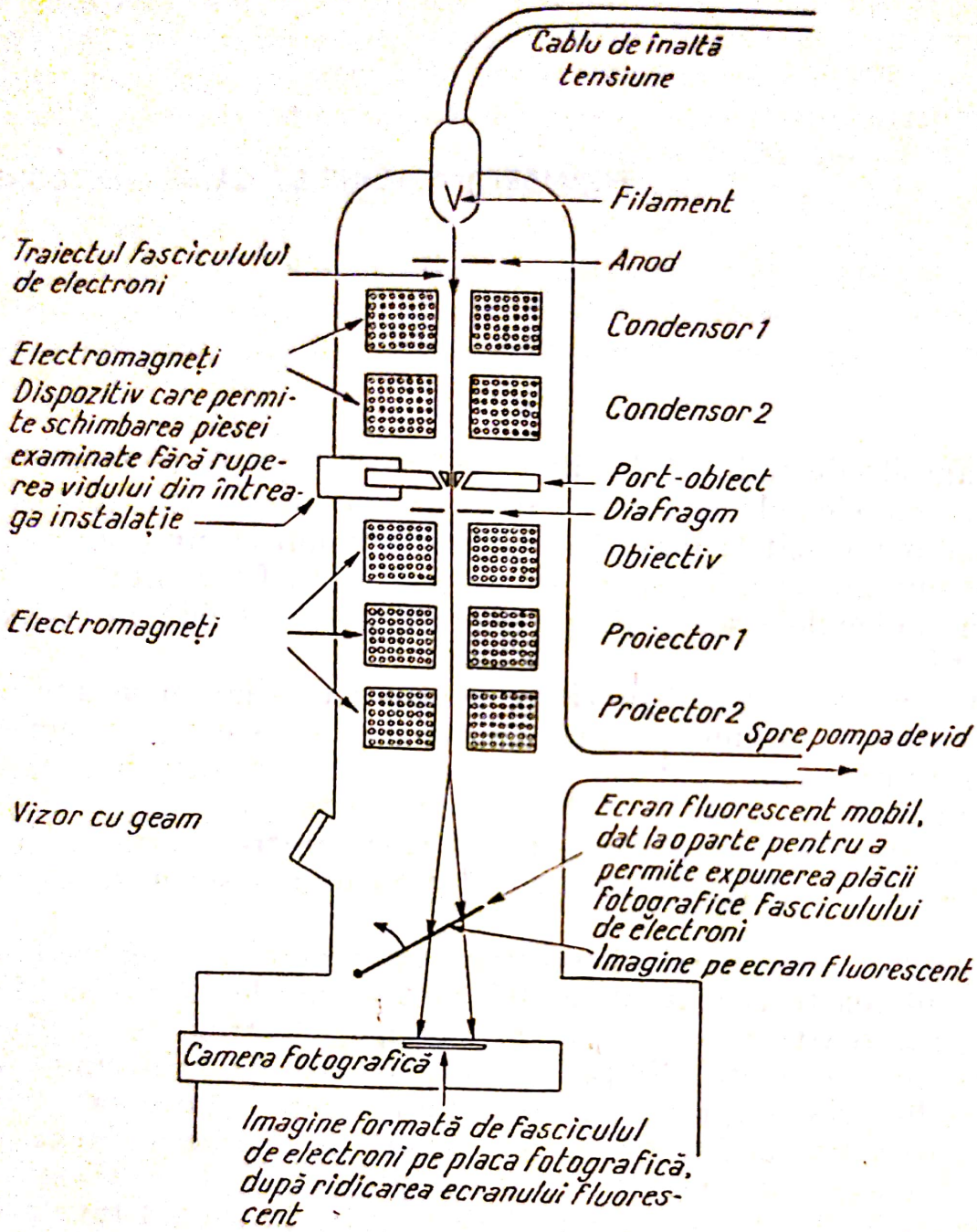


Fig. A. 4. Microscopul electronic.

Sursa de electroni este constituită de un filament încălzit, aflat la extremitatea superioară a unei coloane în care s-a făcut vid. Electronii sînt accelerați prin voltajul mare (50 KV) care se realizează între filament și anod. Ei trec printr-un orificiu al anodului și apoi coboară prin centrul unor bobine electromagnetice (condensator 1 și 2) care îi concentrează pe obiectul examinat. Dedesubtul obiectului examinat se găsește diafragmul (un dispozitiv cu un orificiu al cărui diametru este reglabil și care mărește contrastul imaginii finale), apoi obiectivul și „lentilele" proiectoare, adică o nouă serie de bobine electromagnetice care concentrează imaginea obiectului cercetat fie pe ecranul fluorescent — pe care este vizibilă putînd fi privită printr-un vizor cu geam — , fie pe o placă fotografică cînd ecranul este ridicat și îndepărtat astfel din calea fasciculului de electroni.

Scanned with OKEN Scanner

fasciculul pe preparat. Bobinele inferioare (obiective şi proiectoare) concentrează electronii ce au traversat obiectivul fie pe un ecran fluorescent (pentru examinare vizuală), fie pe o placă fotografică (pentru înregistrare definitivă a imaginii electronice).

Variaţia de intensitate (contrastul) a imaginii finale depinde de variaţia densităţii electronilor la nivelul diferitelor regiuni ale preparatului. Electronii ce traversează regiunile mai dense sînt mai puţin absorbiţi ; ei suferă mai curînd fie o împrăştiere, astfel încît nu ajung să treacă prin apertura obiectivului, fie o altă pierdere de energie în cursul traversării probei, neînsoţită de o deviere importantă. Electronii care au pierdut din energie pe această cale îşi continuă drumul prin apertura obiectivului şi ajung pînă la planul imaginii finale, fiind însă răspîndiţi în mod difuz pe suprafaţa acestui plan datorită aberaţiilor cromatice ale obiectivului şi ale lentilelor proiectoare. Numai electronii care traversează apertura obiectivului cu o viteză apropiată de cea medie sînt focalizaţi de către lentilele obiectivului şi de cele proiectoare, în aşa fel încît contribuie la conturarea detaliilor de pe imaginea finală.

Factorii care participă la obţinerea contrastului unei imagini electronoptice sînt, aşadar, complecşi, iar într-o imagine uşor defocalizată această complexitate creşte şi mai mult, căci în acest caz peste efectele deja discutate se suprapun efectele de contrast de fază. În microscopia electronică cu putere înaltă de mărire trebuie evitate cu deosebită grijă artefactele datorite defocalizării, de preferinţă prin impresionarea unei serii de plăci cu diverse focalizări în jurul punerii la punct (serie de focalizare), eliminînd apoi pe cele care, aflîndu-se de o parte sau de cealaltă a focarului, sînt neclare. S-a observat că, în imaginea finală, contrastul poate fi accentuat prin micşorarea aperturii obiectivului, dar există o limitare teoretică a acestui procedeu, în sensul că o deschidere foarte mică limitează apertura numerică şi în consecinţă puterea de separare a microscopului. În plus, apertura mai poate induce aberaţii şi dacă nu este perfect curată. Cu cît apertura este mai mică, cu atît ea se va murdări mai curînd în cursul folosirii, ceea ce are ca urmare scăderea calităţii imaginii finale.

În momentul traversării obiectivului, electronii sînt împrăştiaţi mai ales ca urmare a ciocnirii cu alţi electroni — cei din interiorul atomilor preparatului. Împrăştierea este mai mare acolo unde densitatea electronilor interni din atomii obiectivu-

lui este mai mare. Mediile de incluzionare folosite în microscopia electronică (metacrilat şi răşini epoxidice), ca şi proteinele, acizii nucleici şi hidrocarbonatele din structurile celulare, sînt alcătuite în mod predominant din atomi de carbon, azot şi oxigen, care au densităţi electronice foarte apropiate, precum şi din hidrogen care, avînd numai un singur electron, contribuie foarte puţin la împrăştierea fasciculului electronic. Ca atare, contrastul inerent al structurilor celulare incluzionate pentru secţiuni fine este foarte mic. Contrastul este realizat în primul rînd de atomii grei, cu densitate electronică relativ mare, cum sînt cei de osmiu sau mangan, care au fost încorporaţi în structurile respective în timpul fixării. Opacitatea electronică corespunde foarte îndeaproape cu densitatea electronică, iar aceasta, la rîndul ei, corespunde în foarte mare măsură cu densitatea fizică.

Un fascicul de electroni, accelerat pînă la un potenţial de 50 kV (voltajul folosit în mod curent în microscoapele electronice obişnuite) are o lungime de undă de 0,006 mμ. Microscopul electronic are astfel o putere separatoare teoretică de 0,003 mμ (sau chiar mai mare, dacă se folosesc tensiuni mai înalte). Cum însă aberaţiile lentilelor electronice restrîng apertura numerică utilizabilă practic şi nu se poate realiza o stabilitate perfectă a tensiunii de accelerare şi a curenţilor din lentile, separarea optimă ce poate fi atinsă în prezent este de 0,5 mμ.

Practic, puterea de separare a microscopului electronic mai este limitată, la examinarea secţiunilor, şi de grosimea acestora. Chiar şi electronii care traversează zonele mai puţin dense ale secţiunii sînt împrăştiaţi şi deviaţi într-o anumită măsură. Aceasta duce la scăderea preciziei imaginii finale şi a puterii de separare. La tensiunile folosite în microscoapele electronice de uz curent, limita puterii de separare impusă de acest efect este

$$\sim \frac{\text{grosimea secţiunii}}{10}.$$

Pentru a obţine în mod efectiv o putere de separare de 1 mμ, secţiunile trebuie să fie mai subţiri de 10 mμ. Folosind asemenea secţiuni ultrafine, ne ciocnim însă de probleme legate de contrastul insuficient — gradul de împrăştiere în regiunile mai dense fiind prea mic pentru a reduce în suficientă măsură intensitatea electronică din porţiunile corespunzătoare ale imaginii.

Scanned with OKEN Scanner

Utilizarea unor tensiuni mai înalte măreşte puterea de separare — la grosimea de secţiune dată —, dar reduce contrastul.

Asigurînd o centrare foarte meticuloasă a unui microscop electronic modern, puterea de separare efectivă poate fi împinsă pînă la 0,5 mμ. Cea mai bună putere de separare obţinută vreodată cu o probă biologică pare să fie în jurul a 2 mμ. Aceasta ridică o problemă foarte importantă, legată de procedeele de determinare a dimensiunilor pe baza microelectronografiilor. Acolo unde grosimea liniei întunecate a microelectronografiei este indicată ca fiind egală cu 2,5 mμ, trebuie considerat că această apreciere este foarte apropiată de limita practică de separare. Chiar dacă grosimea reală a stratului din secţiune care este opac faţă de electroni este mai mică decît această valoare, împrăştierea electronilor în secţiune, aberaţiile etc. pot lărgi linia întunecată din imagine cam pînă la aceste dimensiuni. Diferenţele dintre grosimile *relative* a două structuri, în cadrul aceleiaşi imagini electronice, pot fi semnificative chiar cînd sînt mai mici decît limita de separare. De asemenea, în cazul unei structuri periodice, cum este teaca de mielină a nervului, unde pentru a evalua grosimea fiecărei lamele rezultatul unei măsurători globale se împarte prin numărul lamelelor, desigur că această estimare este mai precisă.

Cînd se lucrează în zona limitei practice de separare a unui microscop electronic, se produce şi o estompare a contururilor. La un grad de separare de 2 mμ, un obiect care în realitate este pătrat, dar are o dimensiune transversală mai mică decît 6 mμ, va apărea ca un cerc. Un hexagon va apărea ca un cerc dacă are o mărime transversală mai mică de 9 mμ.

Anexa 5

PRESIUNEA OSMOTICĂ. ECHILIBRUL IONIC TRANSMEMBRANIC

Dacă o soluţie apoasă este despărţită de apa pură printr-o membrană semipermeabilă — permeabilă pentru apă, dar nu şi pentru substanţa dizolvată — şi dacă presiunea totală este, la început, egală de ambele părţi ale membranei, se va produce o deplasare a apei prin membrană, ducînd la diluarea soluţiei. La realizarea presiunii globale de partea în care se află soluţia contribuie parţial apa şi substanţa dizolvată, în timp ce presiunea globală de partea apei pure este determinată numai de moleculele de apă. Presiunea apei va fi deci iniţial mai ridicată de partea apei pure, ca atare mai multe molecule de apă vor bombarda pe secundă această faţă a membranei şi, în consecinţă, membrana va fi traversată de mai multe molecule în acest sens, ceea ce va da naştere unui flux net dintr-o parte în cealaltă.

Acest sistem poate ajunge la echilibru numai prin creşterea presiunii globale de partea soluţiei, pentru a realiza egalizarea presiunii hidrice de ambele părţi ale membranei. Cînd acest echilibru este atins, diferenţa dintre presiunile globale exercitate pe cele două feţe ale membranei, denumită *presiunea osmotică* a soluţiei, este reprezentată de presiunea exercitată de moleculele substanţei dizolvate. La concentraţii suficient de joase pentru ca interacţiunile dintre moleculele dizolvate să fie neglijabile, presiunea este egală cu aceea exercitată de un gaz perfect la aceeaşi temperatură şi concentraţie.

Presiunea osmotică (în dine/cm^2) $= RTc$,

unde c este concentraţia substanţei în moli/cm^3,
R — constanta gazelor (în ergi/grad/mol) şi
T — temperatura absolută.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul unei soluții în care sînt dizolvate mai multe substanțe sau săruri disociate, presiunea osmotică globală reprezintă însumarea contribuțiilor fiecărui tip de substanță sau ion (de exemplu, K^+) din soluție, după cum presiunea globală exercitată de un amestec de gaze este suma presiunilor lor parțiale. Termenul de *soluție izotonică* este folosit pentru a desemna o soluție ce exercită aceeași presiune osmotică ca și citoplasma celulară (de exemplu, soluția 0,15 M de clorură de sodiu pentru celulele de mamifer). Concentrația izotonică a unei substanțe solubile, pentru fiecare tip de celulă dat, se determină experimental prin urmărirea comportării celulelor în soluții de concentrație variabilă a substanței respective. Celulele suspendate în soluții hipertonice pierd apă și se ratatinează; celulele bacteriene și vegetale suspendate în soluții hipertonice se depărtează prin ratatinare de pereții rigizi care le înconjură. În soluții hipotonice, celulele lipsite de pereți rigizi captează apă, devin sferice și apoi plesnesc.

Pentru a deduce o ecuație care să coreleze diferențele de potențial electric și de concentrație ionică de o parte și de alta a unei membrane sau a unei interfețe între două faze, este necesară mai întîi calcularea potențialului termodinamic al unei soluții (ecuația 1). Cititorul fără cunoștințele matematice necesare va putea trece cu ușurință peste această demonstrație, urmărind eventual principiul care stă la baza ei. Acceptînd ca stabilită ecuația 1, el va putea totodată să vadă cum condiția de echilibru (ecuația 2) rezultă din egalitatea potențialelor termodinamice de ambele părți ale membranei.

Pentru a calcula potențialul termodinamic al unei soluții simple trebuie să reamintim că orice soluție poate exercita o presiune osmotică și că, în principiu, această presiune poate fi folosită pentru efectuarea unui lucru mecanic. Tipul de aparat de care am avea nevoie pentru a efectua o asemenea operație ar fi un recipient cilindric, cu un piston mobil construit dintr-un material semipermeabil — permeabil pentru solvent și impermeabil pentru substanța dizolvată (fig. *A*.5). Dacă soluția se află în partea inferioară a cilindrului din fig. *A*.5 și solventul pur se află în vas deasupra pistonului semipermeabil, presiunea osmotică va determina ridicarea pistonului iar greutățile de pe platanul fixat pe piston vor dobîndi o energie potențială mai mare. Soluția de sub piston va deveni mai diluată. Creșterea energiei potențiale a greutăților este o măsură a lucrului efectuat,

Scanned with OKEN Scanner

iar lucrul mecanic maxim ce poate fi efectuat definește modificarea potențialului termodinamic al soluției ce însoțește modificarea de concentrație.

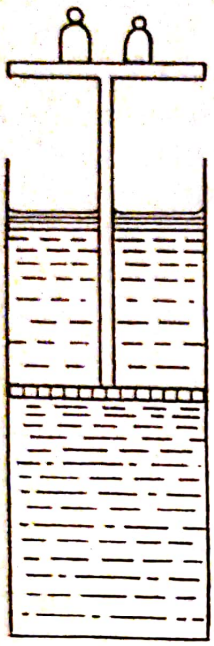


Fig. A. 5. Experiență care demonstrează capacitatea unei soluții de a efectua un lucru mecanic.

Soluția se află într-un vas cilindric, dedesubtul unui piston confecționat dintr-un material semipermeabil, adică permeabil față de solvent, dar nu și față de substanța dizolvată. Partea cilindrului care se găsește deasupra membranei semipermeabile este umplută cu solvent pur. Presiunea osmotică produce o ridicare a pistonului și înalță greutățile așezate pe platan (legat de piston printr-o vergea).

Dacă presiunea osmotică este egală cu P atunci cînd pistonul se află la înălțimea x deasupra bazei cilindrului și dacă aria pistonului este A, lucrul mecanic maxim pe care-l va putea efectua cînd se ridică pe o distanță foarte mică dx este:

$$PAdx.$$

Dacă înălțimile inițială și finală ale pistonului sînt, respectiv, x_0 și x_1 lucrul mecanic maxim pe care îl poate efectua este:

$$\int_{x_0}^{x_1} PA\,dx = RT \int_{x_0}^{x_1} Ac\,dx$$

(cu condiția ca concentrația să fie destul de scăzută pentru ca ecuația presiunii osmotice scrisă mai sus să fie validă).

Concentrația este legată de x prin ecuația:

$$cx = c_0 x_0,$$

în care c_0 este concentrația inițială. În cazul în care cantitatea totală a substanței dizolvate este de un mol, atunci:

$$c_0 x_0 A = 1, \text{ de aceea } cxA = 1 \text{ și } Ac = \frac{1}{x}.$$

Lucrul mecanic maxim efectuat este:

$$RT \int_{x_0}^{x_1} \frac{1}{x} dx = RT \log_e \frac{x_1}{x_0} = RT \log_e \frac{c_0}{c_1} = RT (\log_e c_0 - \log_e c_1),$$

unde c_1 este concentrația substanței dizolvate la sfîrșitul experienței. În felul acesta variația potențialului termodinamic per mol

$$= RT \text{ (variația } \log_e c) \ldots\ldots \boxed{\text{Ecuația 1}}$$

Echilibrul de membrană se realizează separat pentru fiecare tip de ion (de exemplu, K^+) pentru care membrana este cît de cît permeabilă. Aceasta înseamnă că pentru fiecare tip de ion pentru care membrana este permeabilă diferența de potențial termodinamic între cele două părți ale membranei trebuie să fie egală cu lucrul mecanic efectuat cînd un mol-ion din acest ion traversează membrana. Dacă diferența de potențial electric de o parte și de cealaltă a membranei este de E volți, lucrul mecanic efectuat este:

$$nEF \text{ jouli,}$$

unde F este constanta lui Faraday (sarcina de pe un mol-ion de ion monovalent, exprimată în coulombi) și n — valența ionului (de exemplu, $n = 2$ pentru Ca^{++} și Mg^{++}, $n = 1$ pentru Na^+ și Cl^-). Specificînd că molul de ioni traversează membrana în direcția creșterii potențialului, lucrul mecanic efectuat va fi pozitiv pentru ionii pozitivi și negativ pentru ionii negativi.

Pentru fiecare ion pentru care membrana este permeabilă:

$$nEF = RT \log_e \left(\frac{\text{concentrația în exterior}}{\text{concentrația în interior}} \right)$$

$$E = \frac{RT}{nF} \log_e \left(\frac{\text{concentrația în exterior}}{\text{concentrația în interior}} \right) \quad \ldots \boxed{\text{Ecuația 2}}$$

În cazul ionilor monovalenți pozitivi, la 20 °C, substituind valorile pentru R (în jouli/grade/mol) și pentru F și adoptînd convenția normală de semn, în care potențialul de membrană este considerat negativ dacă interiorul celulei este la un potențial mai mic decît exteriorul ei:

$$E = 58 g_{10} \left(\frac{\text{concentrația în exterior}}{\text{concentrația în interior}} \right) \text{milivolți.}$$

Pentru ionii monovalenți negativi, la 20 °C:

$$E = 58 g_{10} \left(\frac{\text{concentrația în exterior}}{\text{concentrația în interior}} \right) \text{milivolți.}$$

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Anexa 6

ORIGINEA VIEȚII

La începutul acestui secol se considera că formarea, pornind de la molecule mici, a unei unități de o complexitate atît de mare ca aceea a unei celule vii este un eveniment atît de improbabil încît, pentru a se explica inițierea proceselor de viață în timpurile primordiale, era necesar să se apeleze dacă nu la intervenția divină, cel puțin la aceea a unor circumstanțe speciale și neobișnuite. Concepțiile ce au circulat încă din evul mediu și chiar mai devreme cu privire la existența în condițiile terestre actuale, a unei generații spontane a organismelor vii din noroi sau nămol au fost, cel puțin aparent, respinse de cercetarea științifică.

Totuși, pe măsură ce se acumulau cunoștințele asupra structurii moleculare a constituenților celulari și asupra unor organisme de tipul virusurilor, ce se află la frontiera dintre viu și neviu, a devenit evident că problema nu era corect formulată. Să analizăm, de exemplu, o altă enigmă asemănătoare a evoluției biologice: apariția bruscă a omului într-o lume de organisme unicelulare pare extrem de improbabilă, dar evoluția lui treptată pe cale naturală, trecînd printr-o serie de organisme cu complexitate crescîndă, este destul de lesne de conceput. În mod asemănător, formarea directă a unei celule pornind de la molecule mici este extrem de improbabilă; dacă însă celula este considerată ca punct culminant al unui proces îndelungat de evoluție biochimică și biomoleculară precedînd evoluția biologică, proces în care moleculele mici se agregă și formează precursori celulari, fiecare treaptă a acestui proces poate fi considerată ca un eveniment firesc și foarte posibil.

Aspectul evoluționist al biologiei moleculare cuprinde atît studiul perioadei ce precede apariția unor unități complexe

de tipul celulelor din organismele actuale, cît şi pe cel al evenimentelor moleculare ce stau la baza specializării şi interacţiunii celulelor în timpul evoluţiei biologice. În această anexă ne vom ocupa numai de etapa primordială; dacă această temă atît de fascinantă nu este tratată decît parţial şi restrîns într-o anexă, aceasta se datoreşte cunoştinţelor noastre actuale atît de limitate şi caracterului atît de speculativ al ipotezelor din acest domeniu. Majoritatea experienţelor în această direcţie au fost concepute cu scopul de a demonstra că anumite tipuri de molecule *s-ar fi putut* forma în mod natural, în condiţiile primordiale. Este, desigur, cu totul altceva să se poată dovedi că reacţiile puse astfel în evidenţă au fost într-adevăr reacţii importante în evoluţia biomoleculară, cu atît mai mult cu cît nu putem fi încă siguri de compoziţia exactă a atmosferei şi de alte condiţii existente în timpurile primordiale.

Dat fiind rolul dominant jucat de proteine în toate procesele biochimice, unele experienţe efectuate de Miller par a avea o semnificaţie deosebită. Acest autor a arătat că dacă un amestec de gaze presupuse a fi fost prezente în atmosfera Pămîntului primordial — hidrogen, metan, vapori de amoniac, vapori de apă, oxid de carbon, hidrogen sulfurat etc. — este închis într-un vas de sticlă deasupra unui strat de apă şi dacă prin amestecul de gaze se lasă să treacă un timp oarecare o descărcare electrică, se observă că în soluţia apoasă apare o diversitate de molecule organice, inclusiv aminoacizi. În timpurile primare, efecte similare ar fi putut fi provocate de furtuni cu descărcări electrice, precum şi de radiaţiile ultraviolete solare care, în acea vreme, erau mult mai intense în păturile joase ale atmosferei decît sînt astăzi, datorită lipsei oxigenului şi deci a stratului de ozon, absorbant de ultraviolete, din straturile superioare ale atmosferei.

Înainte să se fi putut forma enzimele sau alte proteine, era necesar să se producă alte două fenomene destul de puţin probabile: ar fi trebuit ca aminoacizii, despre care se poate presupune că erau prezenţi în concentraţii foarte mici în mările şi lacurile primitive, să fie într-un fel oarecare concentraţi şi legaţi între ei pentru a se forma lanţuri peptidice. Formarea legăturilor peptidice necesită energie; în momentul de faţă, sinteza proteică într-o celulă necesită prezenţa unor enzime, a unor acizi nucleici şi a ATP. S-ar putea ca în mările primordiale să fi existat diverse tipuri de compuşi „macroergici" (metafosfaţi, fosfocianat etc.), dar este tot atît de posibil să fi lipsit coen-

Scanned with OKEN Scanner

zimele proteice necesare pentru catalizarea formării primelor proteine.

Preocupat de aceste probleme, Wilson a extins lucrările lui Miller, arătînd că în condiţiile de reacţie ce se creează atunci cînd o descărcare electrică traversează un amestec gazos asemănător atmosferei primordiale, moleculele de metan se înlănţuiesc formînd molecule mai mari de hidrocarburi. Analizînd, la sfîrşitul experienţelor sale, compoziţia amestecului de gaze, el a pus în evidenţă hidrocarburi conţinînd pînă la cinci atomi de carbon. De asemenea, a observat că într-un stadiu precoce al acestor reacţii se formează la interfaţa aer-apă o pătură superficială de lipide polare (lipidele polare sînt prezentate şi analizate în cap. 6) şi că, pe măsură ce se desfăşura reacţia, aceste molecule se interconectau, dînd naştere unei pături insolubile. Faptul că în amestecul gazos nu s-au găsit molecule cu un conţinut de peste cinci atomi de carbon nu indică neapărat că nu s-ar fi putut forma şi molecule mai mari, dat fiind că era de aşteptat ca acestea să se condenseze la suprafaţa apei sub forma unui strat lichid de lipide. Wilson a conchis, de aceea, că în experienţele sale moleculele sintetizate pornind mai ales de la metan şi care conţineau şase sau mai mulţi atomi de carbon (atît hidrocarburi pure, cît şi alte molecule, conţinînd în plus grupări SH şi NH_2 provenite din reacţii în care participă hidrogenul sulfurat şi vaporii de amoniac) s-au condensat la nivelul suprafeţei şi s-au înlănţuit apoi între ele pentru a forma o peliculă insolubilă, fie ca un efect direct al descărcării, fie datorită atomilor şi moleculelor reactive ce au luat naştere în urma acesteia. La fel ca în cazul experienţei lui Miller, putem presupune că efecte asemănătoare pot avea loc şi sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete.

Posibilitatea formării, în condiţiile primordiale, a unor pelicule de natură predominant hidrocarbonică purtînd însă, pe faţa îndreptată spre apă, o reţea de grupări —SH, —NH_2 şi =O, oferă o bază promiţătoare pentru speculaţii şi experienţe viitoare asupra evoluţiei biomoleculare. O peliculă de acest tip reprezintă, în primul rînd, o suprafaţă pe care s-ar putea adsorbi şi concentra moleculele mici — de exemplu, aminoacizii — prezente în mările şi lacurile primordiale. În al doilea rînd, s-ar fi putut ca, în anumite cazuri, grupările polare ale stratului să fi fost dispuse, din întîmplare, în aşa fel încît să fi catalizat reacţiile chimice dintre moleculele adsorbite pe această suprafaţă, printre aceste reacţii incluzîndu-se, poate, şi legarea

Scanned with OKEN Scanner

reciprocă a aminoacizilor sub formă de lanţuri peptidice. S-ar putea ca prima etapă în acest proces să fi constat în legarea covalentă a aminoacizilor de pelicula de suprafaţă, prin legături macroergice (în mod asemănător cu legarea aminoacizilor de ARN de transfer în cadrul proceselor actuale de sinteză proteică). Energia necesară pentru formarea unor astfel de legături ar fi putut proveni — aşa cum se presupune şi pentru energia răspunzătoare de interconectarea moleculelor în pelicula superficială — din energia furtunilor electrice, a radiaţiilor ultraviolete etc., fie direct, fie prin intermediul compuşilor „macroergici".

Mai există şi un alt rezultat posibil şi extrem de interesant al formării peliculelor superficiale. Să presupunem, conform ilustrării schematice din fig. *A*. 6, că vîntul ar sufla deasupra unui lac acoperit cu o asemenea peliculă. Unele picături, smulse de vînt de pe suprafaţă şi căzînd apoi înapoi în lac, ar putea astfel ajunge în masa lichidului, dedesubtul suprafeţei acoperite cu un strat biomolecular de lipide polare (vezi descrierea structurii membranelor în cap. 6). Dacă straturile superficiale sînt suficient de stabile (ca rezultat al interconectării moleculelor constituente), această picătură va fi şi ea stabilă şi va conţine un volum mic de lichid izolat de mediul înconjurător printr-o membrană. Mai mult decît atît, pe ambele feţe — internă şi externă — ale acestei membrane s-ar putea găsi grupări catalitice, creînd premisele unui transport activ al moleculelor mici prin grosimea membranei. O celulă primordială de acest tip ar putea creşte prin apoziţia progresivă de substanţă pe suprafaţa ei. (Pe măsură ce dimensiunea sa se măreşte, creşte şi probabilitatea ca ea să fie dezmembrată de către curenţi, mai cu seamă în apele agitate ; capetele hidrofobe ale membranei rupte vor avea tendinţa să se reunească, dînd naştere unor celule-fiice mai mici.)

Este de bănuit că apoziţia de substanţă, fie pe o membrană, fie pe un agregat molecular este, într-o primă fază, un proces nedirijat care duce la „creştere" prin adăugare de material asemănător, dar nu neapărat identic. Pentru a se realiza o autoreproducere corectă, este necesară prezenţa unui material capabil fie să catalizeze propria sa sinteză, fie să asigure legarea pe el numai a moleculelor din care este el însuşi compus. În cazul cristalelor, acest lucru se produce în mod foarte simplu şi nu este exclus ca anumite molecule mici sau anumiţi polimeri să fi jucat, în membranele sau agregatele moleculare primitive, rolul de centri de condensare pentru molecule mici sau polimeri

Scanned with OKEN Scanner

identici, inițiind astfel autoreproducerea cel puțin a unei părți din materialul în curs de creștere. Pare de asemenea posibil ca, într-un stadiu relativ precoce, să se fi format lanțuri de nucleotizi și acizi nucleici care să fi dirijat sinteza ulterioară de acizi nucleici, ducînd la formarea de lanțuri cu secvențe complementare, așa cum se consideră astăzi că se petrec lucrurile în cazul ADN (cap. 8 și 9).

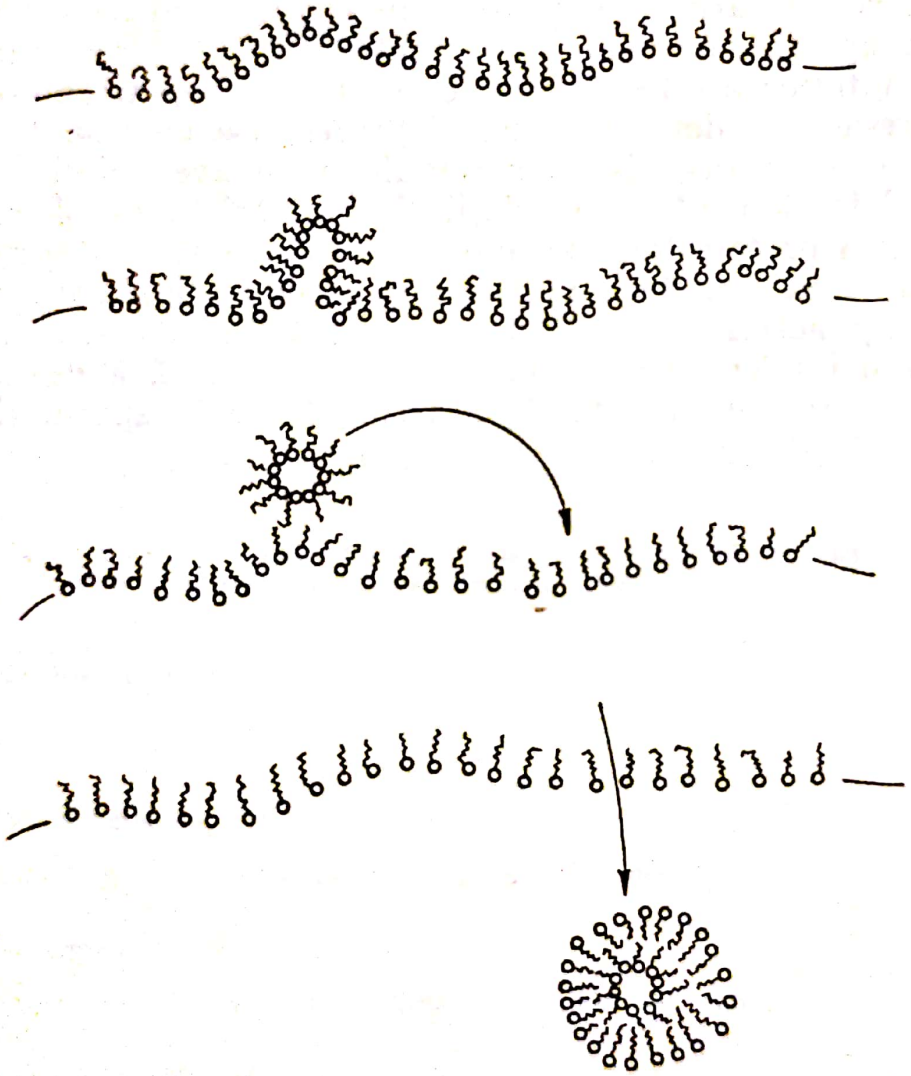


Fig. A.6. Imagine schematică reprezentînd modul posibil de formare a celulelor primitive.

Se presupune că un vînt suflînd deasupra unui lac acoperit cu o peliculă de lipide polare smulge mici picături, care ulterior cad înapoi în lac. Lipidele polare sînt reprezentate în același mod ca în fig. 6 5.

Scanned with OKEN Scanner

Modul în care acizii nucleici au ajuns să controleze asamblarea aminoacizilor în secvenţe specifice este cu mult mai greu de imaginat. Proteinele precoce s-au format probabil prin înlănţuirea reciprocă întîmplătoare a aminoacizilor, iar interacţiunea complexă dintre proteine şi acizi nucleici, care — după cum se ştie astăzi — stă la baza controlului sintezei proteice (cap. 12), trebuie să fie rezultatul unei lungi evoluţii biomoleculare. (Se presupune că factori cum ar fi capacitatea de supravieţuire şi reproducere, existenţa unui potenţial de dezvoltare etc. joacă un rol tot atît de important în mecanismul evoluţiei celulelor şi a agregatelor moleculare primitive, ca şi în evoluţia biologică ulterioară.) Pe măsură ce se vor îmbogăţi cunoştinţele noastre asupra detaliilor acestui proces, aşa cum se desfăşoară el în celulele organismelor actuale, vom avea, desigur, şi o bază mai bună pentru speculaţii şi cercetări în problema evoluţiei sintezei proteinelor. Dincolo de problema sintezei proteice se ridică aceea a modului în care este coordonată şi controlată creşterea şi activitatea celulelor (cap. 10). Şi în acest caz este necesară o înţelegere prealabilă mai aprofundată a desfăşurării acestor procese, înainte de a putea trece la speculaţii cu adevărat folositoare asupra evoluţiei lor.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1
EXAMINAREA CELULELOR VII

Un manual bun de citologie:

De Robertis, E. D. P., Nowinski, W. W. şi Saez, F. A., *Cell Biology*, ed. a 4-a, W. B. Saunders, Philadelphia, 1965.

Alte cărţi în care sînt tratate problemele discutate în acest capitol:

Brachet, J. şi Mirsky, A. E. sub red., *The Cell*, 5 vol., Academic Press, New York, 1959.

Picken, L. E. R., *The Organisation of Cells and other Organisms*, Clarendon Press, Oxford, 1960.

Istoricul dezvoltării citologiei şi microanatomiei:

Hughes, A. F. W., *A History of Cytology*, Abelard Schuman, London, 1959.

Singer, C. şi Underwood, E. A., *A Short History of Medicine*, ed. a 2-a, Clarendon Press, Oxford, 1962.

Mişcarea celulelor

Motilitatea celulară şi contactul celular, „Exp. Cell. Res.", *supl. 8*, 1961.

Chimiotactismul

Harris, H., „Physiol. Revs.", *34*, 529, 1954.

Pinocitoza

Brandt, P. W., „Exp. Cell. Res.", *15*, 300, 1958.

Adeziunea celulară

Inhibiţia prin contact a motilităţii:

Abercromble, M. şi Ambrose, E. J., „Exp. Cell. Res.", *15*, 332, 1958.

Scanned with OKEN Scanner

Moscona, A. şi Moscona H., „J. Anat.", *86*, 287, 1952.
Moscona A., „Exp. Cell. Res.", *22*, 455, 1961.

Mitocondriile

Novikoff, A. B., în *The Cell*, sub red. J. Brachet şi A. E. Mirsky, vol. 2, Academic Press, New York, 1959.

Nucleul şi mitoza

Mazia, D. în *The Cell*, sub red. J. Brachet şi A. E. Mirsky, vol. 3, Academic Press, New York, 1959.
Hughes, A. F. W., *The Mitotic Cycle*, Butterworth, London, 1952.

Capitolul 2
ROLUL PROTEINELOR

Vezi bibliografia generală pentru capitolul 3.

Izolarea proteinelor

Electroforeză:

Tiselius, A., „Biochem. J.", *31*, 313, 1937.
Bier, M., sub red., *Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1959.
Wolstenholme, G. E. W. şi Millar, E. C. P. sub red., *Paper electrophoresis*, Churchill, CIBA Foundation Symposium, London, 1956.

Electroforeza în gel de amidon:

Poulik, M. D. şi Smithies, O., „Biochem. J.", *68*, 636, 1958.

Difuziunea în gel Oudin-Ouchterlony şi imunoelectroforeza:

Crowle, A. J., *Immunodiffusion*, Academic Press, New York, 1961.

Enzime

Dixon, M. şi Webb, E. C., *Enzymes*, Longmans, London, 1958.
Boyer, P. D., Lardy, H. şi Myrback, K. sub red., *The Enzymes*, 8 vol., ed. a 2-a, Academic Press, New York, 1959.

Rolul enzimelor în metabolism

Baldwin, E., *Dynamic Aspects of Biochemistry*, ed. a 3-a, University Press, Cambridge, 1957.

Centrifugare diferenţială

Claude, A., „Proc. roy. Soc.", *B142*, 177, 1954.
Allfrey, V. în *The Cell*, sub red. J. Brachet şi A. E. Mirsky, vol. 1, Academic Press, New York, 1959.

Scanned with OKEN Scanner

Centrifugarea amibelor:

Holter, H., „Proc. roy. Soc., *B142*, 140, 1954.

Reînnoirea metabolică a proteinelor

Schoenheimer, R., *The Dynamic State of Body Constituents*, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1946.

Rittenberg, D., „Harvey Lectures", *44*, 200, 1948—1949.

Tarver, H., în *The Proteins*, sub red. H. Neurath și K. Bailey, vol. 2B, Academic Press, New York, 1953.

Reînnoirea proteinelor în mușchiul de mamifer:

Simpson, M. V. și Velick, S. F., „J. biol. Chem.", *208*, 61, 1954.

Capitolul 3
STRUCTURA MOLECULELOR PROTEICE MICI

Proprietățile fizice și chimice ale proteinelor:

Neurath, H., sub red., *The Proteins*, ed. a 2-a, 4 vol., Academic Press, New York, 1965.

Structura primară

Determinarea structurii primare a insulinei:

Stanger, F., *Currents in Biochemical Research*, sub red. D. E. Green, Interscience, New York, 1956.

Structura secundară

Cercetări mai vechi asupra proteinelor fibrilare:

Astbury, W. T., și Woods, H. J., „Phil. Trans.", *A232*, 333, 1934.

Tipuri de structuri secundare propuse pentru lanțurile peptidice înainte de 1950:

Bragg, W. L., Kendrew, J. C. și Perutz, M. F., „Proc. roy. Soc." *A203*, 321, 1950.

α-helixul:

Pauling L., Corey, R. B. și Branson, H. R., „Proc. nat. Acad. Sci. Wash.", *37*, 205, 1951.

Gradul de răsucire și înfășurare secundară

Cercetări asupra rotației optice produse de soluțiile de peptide:

Doty, P., în *Biophysical Science*, sub red. J. L. Oncley, Wiley, New York, 1959.

Structura terțiară și cuaternară

Studii de difracție cu raze X asupra mioglobinei și hemoglobinei:

Kendrew, J. C. și colab., „Nature", *181*, 662, London, 1958.

Scanned with OKEN Scanner

Perutz, M. F. şi colab., „Nature", *185*, 416, London, 1960.
Kendrew, J. C. şi colab., „Nature", *185*, 422, London, 1960.
Perutz, M. F., „Nature", *194*, 914, London, 1962.
Idem, *Proteins and Nucleic Acids*, Elsevier, Amsterdam, 1962.

Desfăşurarea moleculelor proteice la interfeţe

Referat general:

Cheesman, D. F. şi Davies, J. T., „Ad. Protein Chem.", *9*, 439, 1954.

Dovezi că structura α-elicoidală se poate păstra la interfeţe:

Malcolm, B. R., „Nature", *195*, 901, London, 1962.

Forţele ce determină structura terţiară şi cuaternară

Tanford, C., în *Symposium on Protein Structure*, sub red. A. Neuberger, Methuen, London, 1958.
Kauzmann, W., „Ad, Protein Chem.", *14*, 1, 1959.
Linderstrøm-Lang, K. şi Schellmann, J. A., în *The Enzymes*, sub red. P. D. Boyer, H. Lardy şi K. Myrbäck, ed. a 2-a, vol. 1, Academic Press, New York, 1959.

Capitolul 4.

STRUCTURILE PROTEICE MARI ŞI RAPORTUL DINTRE STRUCTURA ŞI FUNCŢIILE PROTEINELOR[1]

Structura virusurilor

Cercetări recente asupra VMT:

Gierer, A., „Prog. Biophys.", *10*, 299, 1960.
Fraenkel-Conrat, H., *Design and Function at the Threshold of Life*, Academic Press, New York, 1962.

Primele cercetări asupra virusului mozaicului galben al napului (VMGN) şi prezentarea proprietăţilor fizico-chimice ale soluţiilor de VMT:

Markham, R., „Prog. Biophys.", *3*, 61, 1953.

Referate generale asupra structurii virusurilor mici:

Klug, A. şi Caspar, D. L. D., „Ad, virus Research", *7*, 225, 1961.
Caspar, D. L. D. şi Klug, A., „Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.", *27*, 1, 1962.

Speculaţii asupra structurii virusurilor:

Crick, F. H. C. şi Watson, J. D., „Nature", *177*, 473, London, 1956.

[1] Restul microfotografiilor, desenelor şi indicaţiilor bibliografice utilizate pentru ilustrarea şi prezentarea problemelor tratate în acest capitol pot fi găsite în HAGGIS, G. H., *The Electron Microscope in Molecular Biology*, Longmans, London, 1968.

Scanned with OKEN Scanner

Referat general cuprinzînd cercetările de microscopie electronică asupra virusurilor prin tehnica „contrastului negativ":
Horne, R. W. şi Wildy, P., „Ad Virus Research", *10*, 101, 1963.
Conţinutul în α-helix al moleculei VMT:
Simmons, N. S. şi Blout, E. R., „Biophys. J.", *1*, 55, 1960.
Acţiunea lanţului de ARN şi VMT asupra stabilităţii agregatelor de proteină virală:
Hart, R. G. şi Smith, J. D., „Nature", *178*, 739, London, 1956.
Discutarea teoretică a formării helixurilor:
Crane, H. R., „Scientific Monthly N. Y.", *70*, 376, 1950, în special pp. 382, 383, 1950.

Bacteriofagul T_2

Mecanismul infecţiei cu fag:
Lwoff, A., „Proc. roy. Soc.", *B154*, 1, 1961.

Mătasea şi cheratinele

Proteinele din mătase:
Lucas, F., Shaw, J. T. B. şi Smith, S. G., „Ad. Protein Chem.", *13*, 108, 1958.
Cheratinele:
Mercer, E. H., *Keratin and Keratinization*, Pergamon, Oxford, 1961.

Colagenul

Schmitt, F. O. şi Glimcher, M. J., două articole în *Biophysical Science*, sub red. J. L. Oncley, Wiley, New York, 1959.
Rich, A. şi Crick, F. H. C., „J. mol. Biol.", *3*, 483, 1961.

Transformarea fibrinogenului în fibrină

Laki, K. şi Gladner, J. A., „Physiol. Revs.", *44*, 127, 1964.

Enzimele peptice

Neurath, H., în *Biophysical Science*, sub red. J. L. Oncley, Wiley, New York, 1959.
Reactivarea ribonucleazei din fragmentele generate de acţiunea subtilizinei:
Richards, F. M. şi Vithayathil, P. J., „J. biol. Chem.", *234*, 1459, 1959.
Activarea probabilă a enzimelor de către hormonii peptidici:
Fong, C. T. O. şi colab., „Proc. nat. Acad. Sci. Wash.", *46*, 1273–1298 1960.

Scanned with OKEN Scanner

Mecanismul acţiunii enzimelor

Natura sediului activ şi mecanismul acţiunii enzimatice:
Koshland, D. E. jr., Ad. Enzymol, *22*, 45, 1960.

Unele efecte ale modificării structurii proteinelor asupra activităţii enzimatice:
Smith, E. L., Light, A. şi Kimmel, J. R., „Biochem. Soc. Symposia", *21*, 88, 1962.

Fotografii ale unor modele provizorii ale ribonucleazei (prin bunăvoinţa lui H. A. Scheraga):
Hirs, C. H. W., „Ann. N. Y. Acad. Sci.", *88*, 611, 1960.

Miozina, actina şi contracţia musculară

Referate generale:
Huxley, H. E., în *The Cell*, sub red. J. Brachet şi A. E. Mirsky, vol. 4, Academic Press, New York, 1960.

Weber, H. H. şi Portzehl, H., „Prog. Biophys.", *4*, 60, 1954.
Perry, S. V., „Physiol. Revs.", *36*, 1, 1956.
Bourne, G. H., sub red., *Structure and Function of Muscle*, 3 vol., Academic Press, New York, 1960.

Primele date în sprijinul „modelului alunecării filamentelor" în contracţia musculară:
Huxley, H. E., Hanson, J., Huxley, A. F. şi Niedergerke, „Nature", *173*, London, 1954, pp. 971—976.

Ipoteză conform căreia reacţiile din cadrul contracţiei ar putea fi asemănătoare cu reacţiile de sinteză a acizilor graşi:
Weber, H. H., *Molecular Biology*, sub red. D. Nachmansohn, Academic Press, New York, 1960.

Ipoteză asupra rolului posibil al „punţilor de legătură" dintre actină şi miozină:
Huxley, A. F., „Prog. Biophys.", *7*, 255, 1957.

Capitolul 5.
EXAMINAREA CELULELOR LA MICROSCOPUL ELECTRONIC

Ham, A. W. şi Leeson, T. S., *Histology*, ed. a 4-a, Pitman Medical, London, 1961.
Bloom, W. şi Fawcett, D. W., *A Text-book of Histology*, ed. a 8-a, W. B. Saunders, Philadelphia, 1962.

În capitolele introductive ale ambelor volume se descriu tehnicile elementare de microscopie electronică şi se redă în mod succint structura electronmicroscopică a celulelor. Este indicată consultarea acestor cărţi în legătură cu relaţia ultrastructura şi histologia clasică[1].

[1]Alte microfotografii, desene şi indicaţii bibliografice utilizate pentru ilustrarea şi prezentarea problemelor tratate în acest capitol pot fi găsite în Haggis, G. H., *The Electron Microscope in Molecular Biology*, Longmans, London, 1967.

Scanned with OKEN Scanner

Structurile de la suprafaţa celulei

Referat general şi observaţiile proprii ale autorului:
Robertson, J. D., „Prog. Biophys.", *10*, 344, 1960.

Membranele bacteriene:
Glauert, A. M., „Brit. Med. Bull.", *18*, 245, 1962.

Dovezi fiziologice în favoarea existenţei unui canal de apă de 30 μ între axoni şi celulele Schwann:
Frankenhaeuser, B. şi Hodgkin, A. L., „J. Physiol.", *131*, *341*, 1956.

Desmozomi şi bare terminale

Referat general asupra structurii şi distribuţiei acestor legături:
Fawcett, D. W., în *Frontiers in Cytology*, sub red. S. L. Palay, Yale University Press, New Haven, 1958.

Detalii structurale fine:
Farquhar, M. G. şi Palade, G. E., „J. Cell. Biol.", *17*, 375, 1963.
Fawcett, D. W., „Exp. Cell. Res.", *supl. 8*, 174, 1961.

În acest supliment sînt tratate şi alte legături intercelulare.

Fagocitoză şi pinocitoză

Prima descriere a pinocitozei:
Lewis, W., „Bull. Johns Hopkins Hosp.", *49*, 17, 1931.

Referat general recent:
Holter, H., „Int. Rev. Cytol.", *8*, 481, 1959.

Mielina nervilor şi bastonaşele retinei

Demonstrarea originală a formării spiralelor:
Genern, B. B., „Exp. Cel. Res.", *7*, 558, 1954.

Referat general asupra structurii mielinei:
Robertson, J. D., „Prog. Biophys.", *10*, 344, 1960.

Ultrastructura fotoreceptorilor:
De Robertis, E., „J. gen. Physiol.", *43*, *supl. 2*, 1, 1960.

Membranele celulare interne

Dispunerea generală a membranelor din interiorul citoplasmei este descrisă în manualele de histologie indicate ca bibliografie generală pentru acest capitol. Date mai amănunţite pot fi găsite în:
Oberling, C., „Int. Rev. Cytol.", *8*, 1, 1959.

Scanned with OKEN Scanner

Haguenau, F., „Int. Rev. Cytol.", 7, 425, 1958.
Sjöstrand, F. S., în *Physical Techniques in Biological Research*, sub red. G. Oster și A. W. Pollister, vol. 3, Academic Press, New York, 1956.

Mitocondriile

Referat general asupra structurii mitocondriilor cu reconstrucții tridimensionale:
Andersson — Cedegren, E., „J. Ultrastructure Res.", *supl. 1*, 97, 1959.

Reticulul endoplasmic într-o celulă proteino-secretoare

Studiu combinat, electronmicroscopic și biochimic, al pancreasului exocrin al cobaiului, trecut în revistă de:
Palade, G. E., în *Electron Microscopy in Anatomy*, sub red. J. D. Boyd, F. R. Johnson și J. D. Lever, Edward Arnold, London, 1961.

Învelișul nuclear

Nucleul în interfază, nucleolul și membrana nucleară:
Bernhard, W., „Exp. Cell. Res.", *supl. 6*, 17, 1958.

Modificările din cursul mitozei într-o celulă vegetală:
Porter, K. R. și Machado, R. D., „J. biophys. biochem. Cytol.", *7*, 167, 1960.

Rezistența electrică ridicată a membranei nucleare în celulele de *Drosophila*:
Loewenstein, W. R. și Kanno, Y., „J. gen. Physiol.", *6*, 1123, 1963.

Aspectul electronmicroscopic al filamentelor fusului mitotic:
Roth, L. E. și Daniels, E. W., „J. Cell. Biol.", *12*, 57, 1962.

Reticulul endoplasmic într-o celulă de mușchi striat

Reticulul sarcoplasmic, „J. biophys. biochem. Cytol.", *10*, *Supl.*, 1961.
Acest supliment cuprinde o traducere a lucrării originale a lui Veratti (1902).
Invaginarea membranei citoplasmatice:
Franzini-Armstrong, C. și Porter, K. R., „J. Cell. Biol.", *22*, 675, 1964.
Huxley, H. E., „Nature", *202*, 1067, 1964.

Capitolul 6.
STRUCTURA ȘI FUNCȚIA MEMBRANELOR

Permeabilitatea membranelor

Davson, H. și Danielli, J. F., *The Permeability of Natural Membranes*, ed. a 2-a, University Press, Cambridge, 1952.
Davson, H., *Textbook of General Physiology*, ed. a 2-a, Churchill, London, 1959.

Scanned with OKEN Scanner

Transportul activ şi difuziunea favorizată

Kleinzeller, A. şi Kotyk, A., sub red., *Membrane Transport and Metabolism*, Academic Press, New York, 1961.

Traversarea membranelor de către ioni

Nervi şi muşchi:

Huxley, A. F., în *Ion Transport across Membranes*, sub red. H. T. Clarke, Academic Press, New York, 1954.
Hodgkin, A. L., „Proc. roy. Soc.", *B148*, 1, 1958.

Eritrocite şi fantome eritrocitare:

Glynn, I. M., „Prog. Biophys.", *8*, 241, 1957.
Stein, W. D., „Exp. Cell. Res.", *11*, 232, 1956.

Acetilcolina la nivelul joncţiunii neuromusculare:

Katz, B., „Proc. roy. Soc.", *B155*, 455, 1962.

Tehnica agrafei de voltaj:

Cole, K. S., „Arch. Aci. physiol.", *3*, 253, 1949.

Proprietăţile lipidelor polare

Deuel, H. T. jr., *The Lipids*, 3 vol., Interscience, New York, 1951.
Macromolecules and Liquid Crystals, „Farad. Soc. Disc.", *25*, 1958.
Luzzati, V. şi Husson, F., „J. Cell. Biol.", *12*, 207, 1962.

Primele modele ale structurii membranelor

Gortner, E., şi Grendel R., „J. Exp. Med.", *41*, 439, 1925.
Danielli, J. F. şi Davson, H., „J. cell. comp. Physiol.", *5*, 495, 1935.

Lucrările dinainte de 1925 sînt trecute în revistă de:

Ponder, E., în *The Cell*, sub red. I. Brachet şi A. E. Mirsky, vol. 2, Academic Press, New York, 1960.

Determinări de capacitate a membranelor cu curenţi de înaltă frecvenţă:

Schwann, H. P., „Ad. Biol. and Med. Phys.", *5*, 147, 1957.

Cercetări electronmicroscopice asupra structurii membranelor. Referat general:

Robertson, J. D., „Biochem. Soc. Symposia", *16*, 3, 1959.

Dimensiunile *in vivo* ale mielinei şi modificări în cursul fixării:

Finean, J. B., „Exp. Cell. Res.", *supl. 5*, 18, 1958.

Structura moleculară a tecii de mielină dedusă din cercetări de difracţie cu raze X:

Engstron, A. şi Finean, J. B., *Biological Ultrastructure*, Academic Press, New York, 1958.

Cercetarea electronmicroscopică a sistemelor lipide-apă:

Stoeckenius, W., „J. Cell. Biol.", *12*, 221, 1962.

Scanned with OKEN Scanner

Examinarea electronmicroscopică a fantomelor eritrocitare:
Hillier, J., și Hoffman, J. F., „J. cell. comp. Physiol.", *42*, 203, 1953.

Interacțiunea dintre proteine și lipide

Lipoproteins, „Farad. Soc. Disc.", *6*, 1949.
Membrane Phenomena, „Farad. Loc. Disc"., *21*, 1956.

Mecanismele moleculare ale transportului activ

Wilbrandt, W., „Int. Rev. Cytol.", *13*, 203, 1962.
Hokin, L. E. și Hokin, M. R., „J. gen. Physiol.", *44*, 61, 1960.
Mitchell, P., „Biochem. Soc. Symposia", *16*, 73, 1959.

Rolul reticulului endoplasmic în celulele musculare

Viteza răspunsului muscular la stimulare:
Hill, A. V., „Proc. roy Soc.", *B136*, 399, 1949.
Stimularea locală a celulelor de broască și șopîrlă:
Huxley, A. F., „Ann. N. Y. Acad. Sci.", *81*, 446, 1959.
Pomparea Ca^{++} în vehiculele unui reticul sarcoplasmic fragmentat:
Hasselbach, W. și Makinose, M., „Biochem. Biophys. Res. Comm.", *7*, 132, 1962.
Rolul reticulului în relaxare:
Ebashi, S., și colab., „J. Biochem.", *47*, 54, 1960.
Parker, C. J., și Gergely, J., „J. biol. Chem.", *236*, 411, 1961.

Sisteme enzimatice mitocondriale

Lehninger, A. L., în *Biophyisical Science*, sub red. J. L. Oncley. Wiley, New York, 1959.
Green, D. E. și Fleischer, S., în *Metabolic Pathways*, sub red. D. M. Greenberg, vol. 1, Academic Press, New York, 1960.
Lehninger, A. L. și Wadkins, C. L., „Ann. Revs. Biochem.", *31*, 47, 1962.
Mitchell, P., „J. gen. Microbiol.", *29*, 25, 1962.
Ball, E. G., și Joel, C. D., „Int. Rev. Cytol.", *13*, 99, 1962.

Cloroplaști

Whittingham, C. P., „Prog. Biophys.", *7*, 319, 1957.
Calvin, M. și Hodge, A. J., două articole în *Biophysical Science*, sub red. J. L. Oncley, Wiley, New York, 1959.
Buvat, R., „Int. Rev, Cytol,". *14*, 41, 1963.

Capitolul 7.
COMPORTAREA CROMOZOMILOR ÎN CURSUL MEIOZEI

White, M. J. D., *The Chromosomes*, ed. a 5-a, Methuen, London, 1961.

Scanned with OKEN Scanner

Crossing-over

Modele ipotetice de formare a chiasmelor:
Pritchard, R. H., în *Microbial Genetics, 10th Symposium of the Society for General Microbyology*, University Press, Cambridge, 1960.

Capitolul 8.
NATURA CHIMICĂ A MATERIALULUI EREDITAR

Vezi bibliografia generală pentru capitolul 10.

Transformarea la bacterii

Descoperirea fenomenului de transformare la bacterii:
Griffith, F. J., „J. Hyg.", *27*, 113, 1928.
Identificarea chimică a principiului transformant:
Avery, O. T., Macleod, C. M. şi McCarty, M., „J. exp. Med.", *79*, 137, 1944.

Variaţii ereditare la virusuri

Demonstrarea faptului că purtător al informaţiei genetice este componenta de acid nucleic:
Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. A. şi Williams, R. C., în *The Chemical Basis of Heredity*, sub red. W. D. McElroy şi B. Glass, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957.

Structura şi modul probabil de replicare a ADN

Vezi indicaţiile bibliografice de la subcapitolul respectiv din capitolul 9.

Dovezi în favoarea replicării semiconservative

E. coli:
Meselson, M. şi Stahl, F. W., „Proc. nat. Acad. Sci. Wash.", *44*, 671, 1958.
Celule de mamifere în cultură:
Chun, E. H. L. şi Littlefield, J. W., „J. mol. Biol., *3*, 668, 1961

Scurgerea informaţiei genetice

Dovezi că genele îşi păstrează integritatea structurală în decursul diferenţierii celulare:
Gurdon, J. B., „J. Embryol. exp. Morph.", *10*, 622, 1962.

Capitolul 9.
STRUCTURA ACIZILOR NUCLEICI ŞI A NUCLEOPROTEINELOR

Chimia nucleotizilor şi a acizilor nucleici:
Davidson J. N., *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, ed. a 4-a, Methuen, London, 1960.
Jordon, D. O., *The Chemistry of the Nucleic Acids*, Butterworth, London, 1960.

Scanned with OKEN Scanner

Duble spirale de ADN

Proprietăţile fizico-chimice ale soluţiilor de ADN:
Peacocke, A. R., „Prog. Biophys.", *10*, 55, 1960.
Sturtevant, J. M. şi colab., „Farad. Soc. Disc.", *25*, 138, 1958.

Structura secundară a ADN:
Astbury, W. T., şi Bell, F. O., „Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.", *6*, 109, 1938.
Astbury, W. T., „Soc. Exp. Biol. Symposia", *1*, 66, 1947.
Furberg, S., „Acta Chem. Scand.", *6*, 634, 1952.
Pauling, L. şi Corey, R. B., „Proc. nat. Acad. Sci. Wash.", *39*, 84, 1953.
Watson, J. D. şi Crick, F. H. C., „Nature", *171*, 737, London, 1953.
Wilkins, M. H. F., Stokes, A. R. şi Wilson, H. R., „Nature", *171*, 738, London, 1953.
Feughelman, M. şi colab., „Nature", *175*, 834, London, 1955.

Studii de proporţie de baze:
Chargaff, E., „Fed. Proc.", *10*, 654, 1951.

Sinteza *in vitro* a ADN:
Kornberg, A., în *Biophysical Science*, sub red. J. L. Oncley, Wiley, New York, 1959.

Dovezi că ADN provenit din surse variate este sub formă de dublă spirală:
Hamilton, L. D. şi colab., „J. biophys. biochem. Cytol," *5*, 397, 1959.

Duble şi triple spirale de polinucleotizi

Polinucleotid fosforilaza:
Grunberg-Manago, M. şi Ochoa, S., „J. Amer. Chem. Soc.", *77*, 3165, 1955.

Interacţiuni între polinucleotizi:
Doty, P., „Biochem. Soc. Symposia", *21*, 8, 1962.

Tipul de legături de hidrogen propus în cazul triplei spirale A—U—U:
Zubay, G., „Nature", *182*, 389, London, 1958.

Studii asupra împerecherii bazelor pe modele moleculare:
Donohue, J. „Proc. nat. Acad. Sci. Wash.", *42*, 60, 1956.
Donohue, J., şi Trueblood, K. N., „J. mol. Biol.", *2*, 363, 1960.

Factori ce determină configuraţia acizilor nucleici

Evaluarea măsurii în care contribuie la stabilitatea dublelor spirale efectele de hidrofobie şi, respectiv, legăturile de hidrogen:
Zubay, G. şi Wilkins, M. H. F., „J. mol. Biol.", *2*, 105, 1960.

ARN şi ADN monocatenari

ADN monocatenar din fagul ø X174:
Sinsheimer, R. L., „J. mol. Biol.", *1*, 43, 1959.

Scanned with OKEN Scanner

Modelul propus pentru structura secundară a unui lanţ monocatenar cu secvenţă întîmplătoare de baze:

Fresco, J. R., Alberts, B. M., şi Doty, P., „Nature", *183*, 98, London, 1960.

Nucleoprotamine şi nucleohistone

Bonner, J., şi TS'O, P. O. P., sub red., *The Nucleohistones*, Holden-Day, San Francisco, 1964.

Cercetări prin difracţie cu raze asupra nucleoproteinelor, capetelor de spermatozoizi etc.:

Feughelman, M. şi colab., „Nature", *175*, 834, London, 1955.
Wilkins, M. H. F., „Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.", *21*, 75, 1956.

Dovezi că histonele pot forma punţi între moleculele de ADN:

Luzzati, V. şi Nicolaieff, A., „J. mol. Biol.", *1*, 127, 1959.
Wilkins, M. H. F. şi Zubay, G., „J. mol. Biol.", *1*, 179, 1959.

Efectul îndepărtării prin digestie a histonelor din nucleele izolate asupra sintezei de ARN mesager:

Allfrey, V. G. şi Mirsky, A. E., „Proc. nat. Acad. Sci.", Wash., *48*, 1590, 1962.

Ribozomi şi virusuri sferice mici

Ribozomi:

Tissieres, A., şi Watson, J. D., „Nature", *182*, 778, London, 1958.
Tissieres, A., Watson, J. D., Schlessinger, D. şi Hollingworth B. R., „J. mol. Biol.", *1*, 221, 1959.

Ribozomi „activi":

Risebrough, R. W., Tissieres, A. şi Watson, J. D., „Proc. Nat. Acad. Sci.", Wash., *48*, 430, 1962.

Agregate de cromozomi angajate în sinteza proteică:

Warner, J. R., Rich, A. şi Hall, C. E., „Science", *138*, 1399, 1962.

Lungimea lanţurilor de ARN din ribozomi:

Doty, P., „Biochem. Soc. Symposia", *21*, 8, 1962.
Kurland, C. G., „J. mol. Biol.", *2*, 83, 1960.

Structura secundară a ARN din ribozomi şi din virusurile mici:

Schlessinger, D., „J. mol. Biol.", *2*, 92, 1960.
Zubay, G. şi Wilkins, M. H. F., „J. mol. Biol.", *2*, 105, 1960.

Capitolul 10.
GENA

Sager, R. şi Ryan, F. J., *Cell Heredity*, Wiley, New York, 1961.

Acest excelent manual modern de genetică cuprinde şi bibliografia de bază pentru problemele cuprinse în capitolul 8.

Scanned with OKEN Scanner

Brand, J. C. D. şi Speakman, J. C., *Molecular Structure*, Arnold, London, 1960.

O tratare relativ netehnică a metodelor folosite pentru analizarea spectrelor de difracţie ale cristalelor de proteine globulare:

Kendrew, J. C. şi Perutz, M. F., în *Haemoglobin*, sub red. F.J.W. Roughton şi J. C. Kendrew, Butterworth, London, 1949.

ANEXA 2

Structura moleculelor:

Pauling, L., *The Nature of the Chemical Bond*, ed. a 3-a, Cornell University Press, 1960.

O tratare mai completă a chimiei fizice a acizilor şi bazelor poate fi găsită în:

Glasstone, S. şi Lewis, D., *Elements of Physical Chemistry*, Macmillan, London, 1960.

ANEXA 3

O introducere în termodinamică, cu referire specială la problemele fiziologiei, poate fi găsită în capitolul introductiv al:

Bayliss, L. E., *Principles of General Physiology*, ed. a 5-a, vol. 1, Longmans, London, 1959.

Stabilitatea α-helixului:

Shellmann, J. A., „Comptes Rendus Lab. Carlsberg", *29*, 223, 1955.
Harrington,, W. F. şi Schellmann, J. A., „Comptes Rendus Lab. Carlsberg", *30*, 21, 1956.

ANEXA 4

Haine, M. E., *The Electron Microscope*, Spon, London, 1961.
Kay, D., sub red., *Techniques for Electron Microscopy*, Blackwell, Oxford, 1961.

ANEXA 5

Osmoza:

Davson, H., *Textbook of General Physiology*, ed. a 2-a, Churchill, London, 1959.

Potenţiale de membrană:

Höber, R., sub red., *Physical Chemistry of Cells and Tissues*, Churchill, London, 1947.

ANEXA 6

Florkin, M., sub red., *Aspects of the Origin of Life*, Pergamon, Oxford, 1960.

Experienţe cu descărcări în gaz:

Miller, S. L., „Biochim. biophys. Acta", *23*, 480, 1957.
Wilson, A. T., „Nature", *188*, 1007, London, 1960.

Formarea celulelor primitive din peliculele superficiale:

Goldacre, R. J., în *Surface Phenomena in Chemistry and Biology*, sub red. I. F. Danielli şi colab., Pergamon, Oxford, 1958.

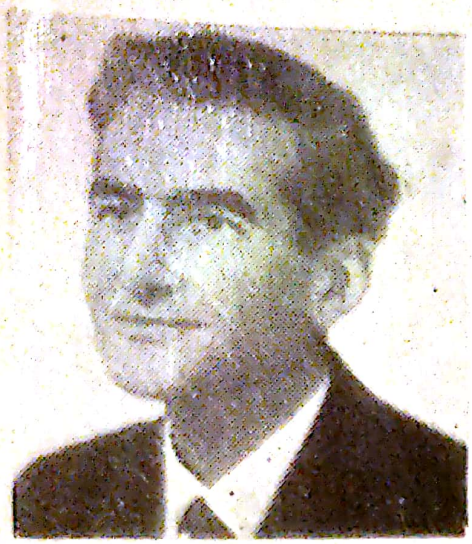
Scanned with OKEN Scanner

Redactor: LAURA MĂRGINEANU
Tehnoredactor: VICTORIA STĂNCULESCU

Dat la cules 05. 02. 1968. Bun de tipar 04. 09. 1968.
Apărut 1968.
Tiraj 3200+140 ex. legate 1/1
Hîrtie scris tip I A 70 g/m².
Format 61×86/16
Coli editoriale 27,49.
Coli tipar 30,00+1 planșă.
Indici de clasificare zecimală:
pentru bibliotecile mari 57,
pentru bibliotecile mici 57.

Întreprinderea Poligrafică Cluj, str. Brassai nr. 5—7, Cluj — Republica Socialistă România, comanda nr. 114/1968.

Scanned with OKEN Scanner

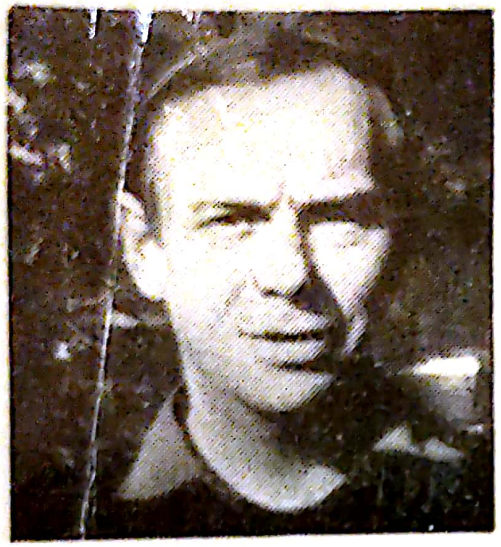


G. H. HAGGIS, M. A., Ph. D. este Senior Lecturer la catedra de fiziologie a Universității din Edinburgh. Preocupările sale științifice sînt legate de structura macromoleculelor și de perfecționarea cercetării electronooptice de finețe a structurii celulelor.

D. MICHIE, M. A., D. Phil. este director la Experimental Programming Unit de pe lîngă Universitatea din Edinburgh. Domeniile principale ale activității sale de cercetare sînt genetica, reproducerea și imunologia reacțiilor de transplantare.

A. R. MUIR, M. D. este profesor de anatomie veterinară la Universitatea din Edinburgh și a efectuat cercetări de histologie și microscopie electronică.

Scanned with OKEN Scanner



K. B. ROBERTS, M. A., D. Phil., M. B., B. S. este Reader la catedra de fiziologie de la London Hospital Medical College și a fost în trecut Senior Lecturer la Edinburgh. Principalele domenii ale activității sale științifice sint culturile de țesuturi, precum și imunologia.

P. M. B. WALKER, B. A., Ph. D. este Reader la catedra de zoologie a Universității din Edinburgh și a efectuat cercetări cantitative cu raze ultraviolete asupra celulelor și componentelor celulare.

Scanned with OKEN Scanner

Progresele realizate începînd din 1950 în înțelegerea bazelor moleculare ale structurii și funcției celulare au fost comparate pe bună dreptate cu cele care au revoluționat fizica la începutul acestui secol. Preocupările diferite ale celor cinci autori ai acestei cărți acoperă în întregime domeniile în care s-au înregistrat aceste progrese, permițîndu-le să trateze toate aspectele cu o competență ce nu ar fi putut fi atinsă prin colaborarea a numai doi sau trei autori.

Capitolul introductiv asupra examinării celulelor vii sub microscopul cu contrast de fază se adresează îndeosebi cititorilor ce nu sînt familiarizați cu imaginea microscopică a celulelor, fiind totodată menit să scoată în relief unele aspecte dinamice ale structurii celulare și să dea o perspectivă biologică datelor statice analizate în capitolele următoare. Capitolele 2 pînă la 6 sînt consacrate importanței structurii și funcțiilor proteinelor ce iau parte la activitatea celulară, precum și alcătuirii și rolului membranelor în ultrastructura celulei. Factorii care determină structura proteinelor — legăturile de hidrogen, efectele de hidrofobie și forțele electrostatice — sînt examinate mai amănunțit în cap. 3, întrucît aceiași factori determină structura membranelor lipoproteice și a nucleoproteinelor, analizate în capitolele următoare.

Capitolele 7 pînă la 12 abordează în același mod discutarea acizilor nucleici. Se descrie comportarea cromozomilor în cursul meiozei și se examinează datele care atestă că baza materială a eredității este reprezentată de acizii nucleici cromozomiali. Se analizează, de asemenea, structura acizilor nucleici și modificările acestora legate de evenimentele mutaționale. Efectele mutațiilor asupra structurii unei proteine sînt ilustrate printr-o discutare a hemoglobinelor, iar capitolul final este consacrat sintezei proteinelor.

Deși cartea este destinată în primul rînd studenților în medicină și biologie, ea nu pretinde din partea cititorului decît cunoștințe de bază din domeniul fizicii și chimiei. Cartea poate fi deci utilă și cercetătorilor fără cunoștințe avansate de biologie și care doresc sau trebuie să se țină la curent cu progresele recente în acest domeniu.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 11.1

Structura primară a mioglobinei și hemoglobinei

	Hemoglobină		Mioglobină	
	α	β		
1		Val		
2	Val	His		
3	Leu	Leu	—	
4	Ser	Tre	Val	A1
5	Pro	Pro	Ala	2
6	Ala	Glu(e)(f)	Gli	3
7	Asp	Glu(g)	Glu	4
8	Liz	Liz	Tri	5
9	Tre	Ser(l)	?	6
10	Asp	Ala	Glu	7
11	Val	Val	Val	8
12	Liz	Tre(m)	Leu	9
13	Ala	Ala	Liz	10
14	Ala	Leu	Ala	11
15	Tri	Tri	Tri	12
16	Gli	Gli	Ala	13
17	Liz(a)	Liz	Liz	14
18	Val	Val	Val	15
19	Gli	Asp	$GluNH_2$	16
20	Ala	|	Ala	AB1
21	His	|	Asp	B1
22	Ala	Val	Val	2
23	Gli	Asp	Ala	3
24	Glu	Glu(n)	Gli	4
25	Tir	Val	His	5
26	Gli	Gli	Gli	6
27	Glu	Gli	Glu	7
28	Ala	Glu(h)	Asp	8
29	Ala	Ala	Ileu	9
30	Leu	Leu	Leu	10
31	Glu	Gli	Ileu	11
32	Arg	Arg	Arg	12
33	Met	Leu	Leu	13
34	Fen	Leu	Fen	14
35	Leu	Val	Liz	15
36	Ser	Val	Ser	16
37	Fen	Tir	His	C1
38	Pro	Pro	Pro	2
39	Tre	Glu	Glu	3
40	Tre	Tre	Tre	4
41	Liz	Tri	Leu	5
42	Tre	Arg	Glu	6
43	Tir	Fen	Liz	7
44	Fen	Fen	Fen	CD1
45	Pro	Glu	Asp	2
46	His	Ser	Arg	3
47	Fen	Fen	Fen	4

40	Tre	Tre	Tre	4
41	Liz	Tri	Leu	5
42	Tre	Arg	Glu	6
43	Tir	Fen	Liz	7
44	Fen	Fen	Fen	CD1
45	Pro	Glu	Asp	2
46	His	Ser	Arg	3
47	Fen	Fen	Fen	4
48	Gli	Gli	Liz	5
49	His	Asp	His	6
50	Leu	Leu	Leu	7
51	Ser	Ser	Liz	8
52	Ser	Tre(o)	Tre	D1
53		Pro	Glu	2
54		Asp	Ala	3
55		Ala	Glu	4
56		Met	Met	5
57		Val	Liz	6
58		Gli	Ala	7
59	Asp	Asp	Ser	E1
60	Ala	Pro	Glu	2
61	Glu	Liz	Leu	3
62	Val	Val	Asp	4
63	Liz	Liz	Liz	5
64	Gli(b)	Ala	Liz	6
65	His(c)	His(i)	His	7
66	Gli	Gli	Gli	8
67	Liz	Liz	Val	9
68	Liz	Liz	Tre	10
69	Val	Val(j)	Val	11
70	Ala	Leu	Leu	12
71	Asp	Gli	Tre	13
72	Ala	Ala	Ala	14
73	Leu	Fen	Leu	15
74	Tre	Ser	Gli	16
75	Asp (d)	Asp	Ala	17
76	Ala	Gli	Ileu	18

(Ordinea resturilor de aminoacizi în porţiunile încadrate ale secvenţei este necunoscută sau încă incertă.) Este marcat sediul substituţiilor caracteristice pentru o serie de hemoglobine anormale: în lanţul α, hemoglobina I: Asp la (a); Norfolk: Asp la (b); M (Boston): Tir la (c); G (Philadelphia): Liz la (d). În lanţul β: hemoglobina S: Val la (e); C: Liz la (f); G (San Jose): Gli la (g); E: Liz la (h); M(Emory): Tyr la (i); M(Milwaukee – I): Glu la (j); D(Punjab): GluNH_2 la (k). În lanţul δ: Tre la (l), Asp la (m), Ala la (n) şi Ser la (o). Lanţurile δ se găsesc într-o componentă minoră a hemoglobinei existente în sîngele adultului normal.

(După Watson, H. C. şi Kendrew, J. C., „Nature", *190*, London, 1961, 670 şi Kendrew, J. C., comunicare personală, 1962.)

Scanned with OKEN Scanner

	Hemoglobină		Mioglobină	
	α	β		
77	Leu	Leu	Leu	19
78	Ala	Ala	Liz	20
79	His	His		
80	Leu	Leu		
81	Asp	Asp		
82	Asp	Asp		
83		Leu		
84		Liz	Liz	EF1
85		Gli	Liz	2
86		Tre	Gli	3
87	Met	Fen	His	4
88	Asp	Glu	His	5
89	Leu	Leu	Glu	6
90	Asp	Asp	Leu	7
91	Ser	Glu	Glu	8
92	Ala	Ala	Ala	F1
93	Pro	Pro	Leu	2
94	Val	Tre	Pro	3
95	Ala	Ala	Liz	4
96	Val	Val	Ala	5
97	Ser	Ser	$GluNH_2$	6
98	His	His	Ser	7
99	Ala	CisH	His	8
100	His	His	Ala	9
101	Liz	Liz	Tre	FG1
102	Leu	Leu	Liz	2
103	Arg	Leu	Fen	3
104	Val	Val	Liz	4
105	Asp	Asp	Ileu	5
106	Pro	Pro	Pro	G1
107	Val	Leu	Ileu	2
108	Asp	Asp	Liz	3
109	Fen	Fen	Tir	4
110	Liz	Arg	Leu	5
111	Leu	Leu	Glu	6
112	Leu	Asp	Fen	7
113	Leu	Leu	Leu	8
114	Ser	Gli	Ser	9
115	Leu	Leu	Glu	10
116	Ala	Val	Ala	11
117	Val	Val	Val	12
118	Leu	Leu	Ileu	13
119	His	His	His	14
120	Val	Val	Val	15

112	Leu	Asp	Fen	7
113	Leu	Leu	Leu	8
114	Ser	Gli	Ser	9
115	Leu	Leu	Glu	10
116	Ala	Val	Ala	11
117	Val	Val	Val	12
118	Leu	Leu	Ileu	13
119	His	His	His	14
120	Val	Val	Val	15
121	Ala	Fen	Leu	16
122	Ala	Ala	?	17
123	Tre	Gli	?	18
124	CisH	CisH	Arg	19
125	His	His	His	GH1
126	|	|	Pro	2
127	His	Liz	Gli	3
128	Glu	Glu(k)	Asp	4
129	Fen	Fen	Fen	5
130	Tre	Tre	Gli	6
131	Pro	Pro	Ala	H1
132	Pro	Pro	Asp	2
133	Ala	Val	Ala	3
134	Leu	Glu	Glu	4
135	Ala	Ala	Gli	5
136	Ser	Ala	Ala	6
137	Leu	Tir	Met	7
138	Asp	Glu	Asp	8
139	Liz	Liz	Liz	9
140	Fen	Val	Ala	10
141	Val	Val	Leu	11
142	Val	Val	Glu	12
143	Ala	Ala	Leu	13
144	Tre	Ala	Fen	14
145	Ser	Gli	Arg	15
146	Ser	Ala	Liz	16
147	Leu	Asp	Asp	17
148	Leu	Leu	Ileu	18
149	Tre	Ala	Ala	19
150	Ser	His	Ala	20
151	Liz	Liz	Liz	21
152	Tir	Tir	Tir	22
153	Arg	His	Liz	23
154			Glu	24
155			Leu	HC1
156			Gli	2
157			Tir	3
158			Gli	4
159			$GluNH_2$	5

Scanned with OKEN Scanner